

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



Magisterská práce

**Molekulární identifikace a fylogeneze produkčních kmenů
Chlorella spp. používaných v řasových biotechnologiích**

Tomáš Vodička

Školitel: Doc. Ing. Miroslav Oborník, PhD.

České Budějovice
2010

Vodička, T., 2010. Molekulární identifikace a fylogeneze produkčních kmenů *Chlorella* spp. používaných v řasových biotechnologiích. [Molecular identification and phylogeny of *Chlorella* spp. production strains utilized in algal biotechnologies, Master Thesis, in Czech] Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 49 pages.

Anotace

Green algae are quite important primary producers in fresh waters. The genus *Chlorella* represents one of algae most frequently utilized in algal biotechnologies to produce biomass, using either autotrophic or heterotrophic cultivation systems. It is then exploited as a food supplement for humans or animals. However, particular species within the genus are morphologically indistinguishable and molecular markers should be used to characterize production strains. This work is aimed to molecularly characterize three production strains of *Chlorella* for patent protection purposes and to specify their phylogenetic and taxonomic position.

Tato práce byla financována z finančních prostředků Laboratoře molekulární taxonomie (LMT).

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s paragrafem 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetové stránce.

V Českých Budějovicích, 5.1.2010

.....

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval každému, kdo přispěl větší či menší mírou ke konečné podobě této práce. Největší dík patří mému školiteli Mírovi Oborníkovi v první řadě za to, že mi vůbec umožnil pracovat ve své laborce, dále za skvělý přístup, užitečné rady a připomínky a vůbec za příkladné vedení po celou dobu vzniku této práce a konečně za nemalou pomoc s finálními úpravami. Děkuji také všem členům Laboratoře molekulární taxonomie za vytvoření přátelské atmosféry a ochotnou pomoc vždy, když jsem ji potřeboval, zejména pak Brabčákovi za pomoc s fylogenetickou analýzou. Děkuji prof. Jiřímu Masojídkovi za poskytnuté kmeny chlorel a informace o jejich kultivaci. Velký dík patří též rodičům za veškerou pomoc a podporu po celou dobu studia a konečně mé přítelkyni Lence za trpělivost a psychickou podporu.

OBSAH

A. Literární přehled	3
1. Úvod	3
2. Vývoj systému zelených řas	3
3. Chlorophyta	6
3.1. Chlorophyceae	8
3.2. Trebouxiophyceae	10
3.3. Ulvophyceae	11
4. rod <i>Chlorella</i>	11
4.1. Role chlorelly ve studiu fotosyntézy	13
5. Studované geny	14
5.1. Ribozomální DNA (rDNA)	14
5.2. ITS (internal transcribed spacer)	15
5.3. Plastidová DNA (pDNA)	15
B. Cíl práce	16
C. Materiály a metody	17
1. Použité kmeny	17
2. Kultivační systém pro autotrofní kmen	17
3. Podmínky kultivace autotrofního kmene	18
4. Podmínky kultivace heterotrofního kmene	19
5. Izolace DNA.....	19
6. Amplifikace požadovaných úseků DNA	20
7. Ligace PCR fragmentů	21
8. Transformace bakterií a testování přítomnosti inzertu	22
9. Izolace plazmidů z pozitivních klonů	22
10. Enzymatické čištění	23
11. Příprava sekvenční reakce	23
12. Navrhování kmenově-specifických primerů pro PCR diagnostiku	23
13. Zpracování dat	24
14. Fylogenetické analýzy	25
D. Výsledky	26
1. Amplifikace genů	26
2. Sekvenční analýza	28

3. Fylogenetická analýza	29
4. Kmenově-specifické primery.....	29
E. Diskuze	32
F. Závěr	34
G. Použitá literatura	35
H. Přílohy	44

A. Literární přehled

1. Úvod

Cílem této práce je molekulárně charakterizovat tři produkční kmeny řasy *Chlorella* spp. z důvodu jejich komerčního využití v řasových technologiích. Smysluplnou charakterizaci produkčních kmenů řasy *Chlorella* spp. lze provést pouze pomocí molekulárních markerů. Hlavní důvod spočívá v tom, že morfologické znaky jsou natolik inducibilní, že pouhá změna kultivačních podmínek by v případě na morfologických znacích postaveného patentu znamenala jeho nepoužitelnost či přímo neplatnost. Nicméně morfologická charakterizace řas má jistě své pevné místo a využitelnost v taxonomii, zejména na vyšší taxonomické úrovni (rod a výše).

Zelené řasy a řasy obecně zaujímají důležité místo v koloběhu látek a energie probíhající v přírodě. Autotrofní řasy jsou společně se sinicemi hlavními primárními producenty organické hmoty ve vodním prostředí (Kalina, 1994). Setkáváme se s nimi na počátku všech potravních řetězců. Mluvíme zde o velice široké skupině organismů, je jich obrovské množství a žijí ve všech možných typech biotopů. Forma stélky (thallus) může být různá, od mikroskopických volně pohyblivých nebo nepohyblivých forem (např. nanoplankton, bentos nebo symbionti lišejníků) až po formy makroskopické. Svoji většinou nepatrnou velikost nahrazují tvarovou rozmanitostí a jemnými detaily v jejich buněčné architektuře. Taktéž struktura stélky se vyznačuje značnou variabilitou. Najdeme zde organismy s kokální (*Chlorella*), vláknitou rozvětvenou (*Draparnaldia*) či nerozvětvenou stélkou (*Oedogonium*) (Mei a kol., 2007) i koloniální typy (*Volvox*). Kokální typy jsou nepohyblivé nebo bičíkaté, povrch buňky může být nahý nebo je kryt šupinkami. Vlákňité druhy obecně vykazují cylindricky protažené buňky, ačkoli řetězce buněk nepravidelného tvaru jsou také známy. Stejně jako předchozí formy i kolonie jsou značně variabilní, mohou být tvořeny několika (*Euastropsis*) až tisíci buňkami (*Hydrodictyon*). *Chlorokybus* tvoří sarcinoidní balíčky několika oválných buněk (Lemieux a kol., 2007), naproti tomu *Volvox* tvoří plovoucí agregáty tisíců buněk (Nozaki, 1996). Větvící se formy se mohou jednoduše rozdvajovat nebo tvoří složitou síť vláken. Buňky zelených řas jsou jednojaderné, výjimečně coenocytické, ve kterých je mnoho jader rozptýleno v cytoplazmě jako u rodu *Caulerpa* (Zuccarello a kol., 2009).

2. Vývoj systému zelených řas

Z počátku byla ke studiu mikrostruktury řas používána výhradně světelná mikroskopie, která na dlouhou dobu poskytla převážnou část dat a na jejichž základě byly první taxonomické

systemy tvořeny. Fakt, že znaky podílející se na životně důležitých procesech buněčného dělení a pohybu gamet nebo nepohlavních zoospor jsou v evoluci vysoce konzervativní, vedl k početným studiím, které srovnávaly mitotický, cytokinetický a pohybový aparát buňky (Stewart a Mattox, 1975). Kromě flagelárního aparátu, tj. bází bičíků, axonemy a kořenu mikrotubulů, jsou v menší míře pro identifikaci zelených řas důležité i způsob rozmnožování, morfologie stélek, struktura plastidu apod. Avšak až nástup elektronové mikroskopie a zejména molekulárních technik znamenal revoluci pro pochopení fylogeneze zelených řas, což se nyní odráží v moderní klasifikaci. Předchozí systém zelených řas je rozdělil především na základě morfologických znaků (Smith, 1950). V omezené míře byl zvažován také způsob rozmnožování (Fott, 1971; Urban a Kalina, 1980). Ve všech zmíněných systémech byly druhy s monodoidní stélkou zařazeny do řádu *Volvocales*, druhy s kokální stélkou do řádu *Chlorococcales* atd. Systém umožnil rychlé zařazení, neodpovídal však evoluci zkoumaných organismů. Jednu z prvních odchylek od tohoto pravidla zaznamenal systém, který navrhl Ettl, (1980).

Ettl použil při popisu tříd zelených řas rozdíly ve stavbě bičíkatých buněk. Zcela nové pojetí klasifikace je spojeno se jmény amerických fykologů K. R. Mattoxe a K. D. Stewarta (1984). Je založeno na ultrastrukturálních znacích, které jsou velmi konzervativní a nemění se vlivem ekologických faktorů. Mezi tyto znaky patří průběh mitózy, cytokineze a stavba flagelárního aparátu. Doplnující znaky poskytuje složení buněčných stěn a v určitých případech také charakter pohlavního procesu. Třídy založené na uvedených znacích mají v tomto systému monofyletický ráz a umožňují určení evolučních vztahů jak mezi zelenými řasami, tak i ve vztahu k dalším zeleným rostlinám. Avšak ani tento systém nebyl plně uspokojivý, neboť byl bezradný při klasifikaci druhů, které nemají bičíky. Také rozdíly mezi nově definovanými třídami byly nejednoznačné.

Přibližně ve stejné době začaly do systematiky zelených řas a řas obecně výrazně promlouvat molekulární metody a velmi rychle doplňovaly nebo spíše častěji úplně překopaly klasické systémy založené na morfolgii a ultrastruktuře. Molekulární studie u zelených řas se do značné míry řídily dřívějšími studiemi prováděnými na vyšších rostlinách či v menší míře na sinicích (Palmer, 1985). Molekulární fylogenetika zelených řas expandovala velmi rychle a to především proto, že přebrala metodické přístupy uplatňované na vyšších rostlinách. Bylo to zejména díky vývoji primerů pro mnoho genů, které byly dříve studovány právě u vyšších rostlin. K odkrývání příbuzenských vztahů zelených řas se používají např. tyto geny: jaderná 18S rDNA, plastidové geny 16S rDNA, *rbcl* a další.

Odhaduje se, že zelené řasy vznikly před 1500 miliony let (Yoon a kol., 2004) a k divergenci vyšších rostlin došlo asi před 425-490 miliony let (Sanderson, 2003). Navzdory starobylosti společného předka rostlin a jejich nejbližších příbuzných (Karol a kol., 2001), vykazují ribozomální DNA a některé plastidové geny vyšších rostlin a řas zřetelnou homologii. Zdroje morfologických, biochemických a molekulárních dat používaných v charakterizaci řas jsou uvedeny v tabulce 1. (Lewis a McCourt, 2004).

I. Buněčná struktura	
Absolutní orientace flagelárního aparátu	O'Kelly a Floyd, 1984; Watanabe a Floyd, 1996;
Přítomnost pyrenoidu, morfologie	Watanabe a Floyd, 1996;
Přítomnost šupin na povrchu buňky, morfologie	Becker a kol., 1994;
Přítomnost vlášení na bičíku, morfologie	Marin a Melkonian, 1994;
Cytokineze, fykoplást, fragmoplást	Mattox a Stewart, 1984;
II. Biochemie	
Fotorespirační enzymy	Suzuki a kol., 1991; Iwamoto a Ikawa, 2000
Druhotné pigmenty	Zignone a kol., 2002
III. Molekulární biologie	
a) Charakteristiky na úrovni genů (jaderné, plastidové, mitochondriální)	
18S rRNA (jader)	Huss a Sogin, 1990; Krienitz a kol., 2003;
26S rRNA (jader)	Buchheim a kol., 2001; Shoup a Lewis, 2003;
geny pro aktin (jader)	An a kol., 1999;
<i>rbcL</i> (plastid)	Manhart, 1994; McCourt a kol., 2000; Zechman, 2003;
<i>atpB</i> (plastid)	Karol a kol., 2001;
<i>nad5</i> (mitoch)	Karol a kol., 2001;
b) Charakteristiky na úrovni genomu	
Přítomnost intronů	Manhart a Palmer, 1990; Dombrowska a Qiu, 2004;
Plastidový genom	Lemieux a kol., 2000; Turmel a kol., 2002c;
Mitochondriální genom	Nedelcu a kol., 2000; Laflamme a Lee, 2003;

Tabulka 1: Příklady srovnání strukturních, biochemických a molekulárních znaků, které byly použity k identifikaci a rozlišení hlavních skupin zelených řas (podle Lewis a McCourt, 2004).

Tato práce se řídí systémem zelených řas dle Lewise a McCourta (2004), který byl založen na analýze sekvencí genů pro 18S rRNA. Tento systém rozlišuje Chlorophyta a Charophyta jako dvě hlavní skupiny v rámci zelených řas.

Linie, kterou označujeme jako Chlorophyta, zahrnuje většinu toho, co je již tradičně nazýváno zelené řasy – sladkovodní jednobuněční (*Chlamydomonas*) a koloniální bičíkovci (*Volvox*), vláknité rozvětvené (*Chaetomorpha*, *Cladophora*) a nerozvětvené formy (*Oedogonium*), mořské řasy (*Ulva*, *Codium*), půdní druhy (*Chlorella*), terestriální epifyti (*Trentepohlia*), mnoho fykobiонтů (*Chlorella*, *Trebouxia*) a další.

Druhá linie Charophyta zahrnuje menší množství taxonů, ačkoli některé z nich (např. *Spirogyra*, *Chara*) jsou velmi rozšířené a známé. Řasy skupiny Charophyta zahrnují druhy jednobuněčné bičíkaté, vláknité rozvětvené i nerozvětvené a poměrně složité formy, které se označují jako parenchymatózní. Vyskytují se ve sladké a brakické vodě; několik skupin žije v půdě, kůře stromů apod. Linie Charophyta zahrnuje nejméně pět malých, ale zřetelných skupin zelených řas vedoucích k velmi rozmanité skupině Embryophyta. Bazální skupinou zelených řas jsou Prasinophyceae, ale jako parafyletická skupina. Hlavní vývojová linie pak zahrnuje tři sesterské skupiny v rámci skupiny Chlorophyta: Ulvophyceae, Trebouxiophyceae a Chlorophyceae. Dále se budu v této práci věnovat podrobněji pouze skupině Chlorophyta, neboť do ní spadá hlavní cíl mého zájmu, rod *Chlorella*.

Nejnovější systém zelených řas rozlišuje 4 třídy: Prasinophyceae (Micromonadophyceae), Charophyceae, Ulvophyceae a Chlorophyceae (Lee, 2008). Tento systém oproti systému Lewise a McCourta (2004), bere Charophyceae jako jednu ze 4 tříd skupiny Chlorophyta a degraduje třídu Trebouxiophyceae, jejíž řády spadají do třídy Chlorophyceae.

Pokud bych měl učinit závěr, dalo by se s trochou nadsázky říct, že různý autor rovná se jiný názor na systematické členění zelených řas. Problém spočívá v dilematu, které ze znaků brát jako důležité pro generální členění, neboť každý z užívaných systémů jeden z nich preferuje a jejich vzájemná syntéza nebyla dosud nikdy provedena (Murray, 2004). Systém zelených řas se stále vyvíjí a zejména molekulární metody do něho vnášejí stále nové světlo, takže lze očekávat, že bude v příštích letech docházet k četným změnám.

3. Chlorophyta

Zelené řasy (Chlorophyta) tvoří počátek složité vývojové větve směřující k zeleným rostlinám (Viridiplantae). Pro zelené řasy je charakteristická rozmanitost ve stavbě stélek, lze u nich najít všechny stupně organizace. Mnohotvárnost stélek a průběh životních cyklů provází

malá variabilita biochemických projevů, které jsou v mnohém společné pro všechny zelené rostliny (Kalina, 1994). Chloroplasty zelených řas jsou obaleny dvěma membránami, uvnitř s lamelami složenými z 2-6 thylakoidů (Rappaport a kol., 1999). Zelené primární plastidy jsou pigmentovány chlorofylem *a* a *b*, α -, β - karoteny a xantofyly, z nichž mezi nejhojnější patří lutein, violaxantin a zeaxantin. Zpravidla obsahují pyrenoid, v němž se nachází aktivní enzym ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza (RuBisCO), který váže oxid uhličitý v temné fázi fotosyntézy. Povrch pyrenoidu je kryt škrobovými zrny. U zelených řas se nevyskytují grana, známá u mechů a zelených rostlin. V chloroplastové matrix se nacházejí rozptýlené ostrůvky DNA (nukleoidy), jejichž počet se zvyšuje v průběhu životního cyklu. Buněčné stěny zelených řas se vyznačují chemickou a strukturní rozmanitostí. V nejjednodušším případě jsou buňky bičíkovců, zoospor a gamet nahé, tj. jejich povrch je kryt pouze plazmatickou membránou. U zoospor bývá takový stav přechodný, po krátké době se oblaní (Kalina, 1994). Povrch buněk ve třídě Chlamydothryceae je kryt glykoproteinovou chlamys, buněčné stěny ostatních zelených řas jsou polysacharidové. Hlavní zásobní látkou je škrob uložený v chloroplastech nebo na povrchu pyrenoidu. U některých druhů se vyskytují i jiné zásobní polysacharidy, zejména mannan a xylan (Watanabe a Floyd, 1996).

Vegetativní buňky zelených řas jsou jednojaderné nebo obsahují jader několik, která se v jednotlivých skupinách liší počtem jadérek a přítomností mikrotubulárních organizátorů, např. cenriol. Velké rozdíly lze také pozorovat v průběhu mitózy (Lewis a McCourt, 2004). Pohyb volně žijících monád, zoospor a gamet je zajišťován bičíky. Vzácně se mezi zelenými bičíkovci vyskytují druhy s jedním nebo třemi bičíky, zpravidla bývají bičíky dva nebo čtyři, někdy i více. Bičíky zelených řas, konkrétně orientace jejich bazálních tělísek a mikrotubulárních kořenů, které jsou uspořádány do kříže důsledkem 180° rotační symetrie. Při pohledu od vrcholu buňky jsou bazální tělíska a mikrotubulární kořeny v jediné správné poloze. Tato poloha se označuje jako absolutní orientace bičíkových bází a hraje důležitou roli v klasifikaci zelených řas a zařazení do systému, zejména u tříd Charophyceae, Ulvophyceae, Chlamydothryceae a Chlorophyceae. Rozlišují se tyto tři základní typy uspořádání bičíkových bází: 1) CW uspořádání, kdy poloha bazálních tělísek odpovídá otáčení ve směru hodinových ručiček (angl. CW- position = clockwise), 2) CCW uspořádání, poloha bazálních tělísek odpovídá pohybu proti směru hodinových ručiček (CCW- position = counter clockwise), 3) DO uspořádání, poloha bazálních tělísek je vzájemně protilehlá (DO - position = direct opposite) (Kalina, 1994).

3.1. Chlorophyceae

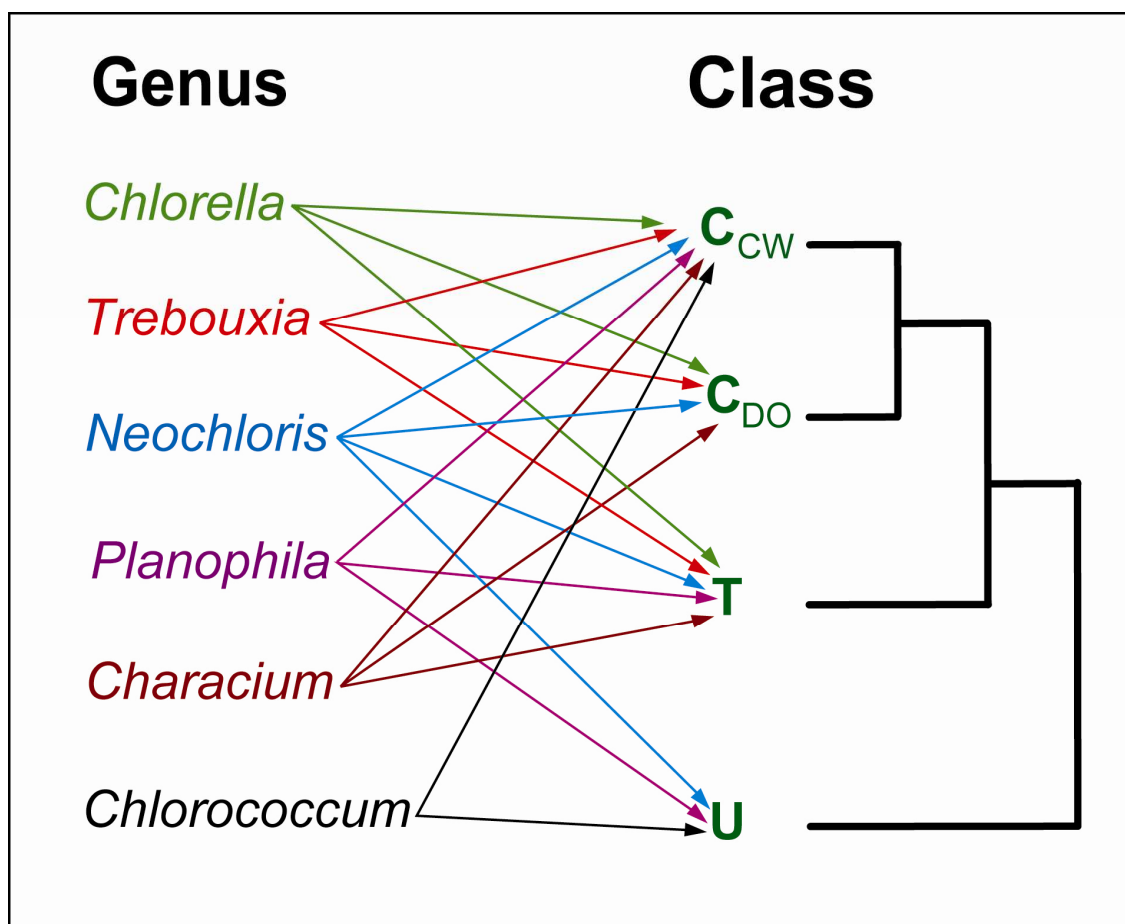
Třída Chlorophyceae (zelenivky) (Kalina, 1994) je velice různorodou skupinou, najdeme zde zástupce s jednobuněčnou (bičíkaté, kokální) nebo mnohobuněčnou stélkou (vláknitá, heterotrichální), žijí jednotlivě nebo tvoří kolonie či cenobia. Zelené řasy této třídy se vyznačují morfologickou variabilitou. Všechny mají haplobiontický životní cyklus. Stěna nebičíkatých stádií je dosti pevná, často vícevrstevná a polysacharidová. U některých druhů bývá ještě vyztužena velice odolným sporopoleninem. Chloroplast je ve většině případů s pyrenoidem (Lee, 2008). Nepohlavní rozmnožování probíhá pomocí autospor a zoospor. Je zde známé i pohlavní rozmnožování (izogamie, anizogamie). Chlorophyceae jsou monofyletická skupina, která zahrnuje některé z nejznámějších zelených řas vůbec, včetně mnoha modelových organismů, např. jednobuněčné bičíkaté *Chlamydomonas* byly použity ke studiu pohybů bičíku (Mitchell, 2000), fotosyntézy (Niyogi, 1999) a modifikace plastidových genomů u sekundárně nefotosyntetických taxonů (Vernon a kol., 2001). Koloniální zelené řasy, jako například *Volvox*, sloužily ke studiu vzniku mnohobuněčnosti, buněčné diferenciaci a pohybu kolonií (Hoops, 1997; Kirk, 2003). *Scenedesmus* a *Pediastrum* mají významné uplatnění jako paleoekologičtí a limnologičtí ukazatelé (Nielsen a Sorensen, 1992; Komárek a Jankovská, 2001).

Dříve zavedené řady byly definovány na základě jejich vegetativní morfologie, formy sexuálního rozmnožování (izogamie, anizogamie nebo oogamie) a způsobu nepohlavního rozmnožování (autospory nebo zoospory). Při buněčném dělení v průběhu cytokineze vznikají dva typy mikrotubulárních systémů, které od sebe oddělí dceřiné buňky. Vytváří se fykoplást, mitotické vřetenko se úplně rozpadne, vytvoří se nová struktura kolmo na jeho původní směr. Pohyb zajišťují 2 nebo 4 bičíky. Bazální tělíška bičíkových párů jsou protilehlá, orientovaná ve směru hodinových ručiček (CW orientace) nebo jsou přímo proti sobě (DO orientace). U některých koloniálních forem jako např. *Volvox* prochází bičíkový aparát vývojovými modifikacemi a bičík je přeorientován tak, aby zajišťoval pohyb celé kolonie (Hoops, 1997). Jiné varianty zahrnují taxony se dvěma nestejnými bičíky (*Heterochlamydomonas*) nebo s bičíky vystupujícími z prohlubně (*Hafniomonas*).

Příliv molekulárních dat (18S rDNA) nashromážděných ze zelených řas v posledních dvou desetiletích vyvolal dramatické změny na všech úrovních klasifikace. U mnoha tradičních řádů (Chlorellales, Chlorococcales, Chlorosarcinales) původně vymezených na základě morfologie je nyní známo, že obsahují fylogeneticky nepřibuzné taxony. To platí zejména pro skupiny, jejichž zástupci jsou si morfologicky podobní nebo případy, u kterých byla absence nějakého znaku použita jako hlavní rozlišovací ukazatel řádu. Četné evoluční ztráty

pohyblivých buněk lze nalézt napříč celé třídy Chlorophyceae. Členové Chlorellales buňky schopné pohybu zcela postrádají. To znamená, že fylogeneticky užitečné informace, které nám flagelární ultrastruktura přináší, nemůžou být u těchto řas porovnávány (Huss a Sogin, 1990). Nejen, že jsou tyto tradiční řady polyfyletické, ale mnoho druhů v rámci rodu bylo reklasifikováno do jiných taxonomických skupin (dokonce tříd), což bylo také z velké části podepřeno molekulárními daty (obr.1) (Lewis a McCourt, 2004).

Na základě molekulárních dat, které byly ještě potvrzeny množstvím biochemických důkazů, byly různé druhy chlorelly rozděleny do skupin Chlorophyceae a Trebouxiophyceae (Huss a Sogin, 1990; Huss a kol., 1999).



Obrázek 1. Příklady extrémní polyfýlie rodů dříve klasifikovaných v řádech Chlorellales, Chlorococcales, Chlorosarcinales. S molekulární a ultrastrukturálními daty bylo prokázáno, že druhy jmenovaných rodů patří do různých fylogenetických skupin. U = Ulvophyceae, T = Trebouxiophyceae, C_{CW} = CW skupina Chlorophyceae, C_{DO} = DO skupina Chlorophyceae.

Od té doby se mnoho dalších rodů ukázalo být polyfyletických, např. rody *Neochloris* a *Characium* jsou nyní ve třech různých třídách (Lewis a kol., 1992; Kouwets, 1995; Watanabe a kol., 2000). Friedl a O'Kelly (2002) podle ultrastrukturálních a molekulárních dat rozdělili

čtyři druhy rodu *Planophila* do Ulvophyceae (2 druhy do dvou odlišných skupin, 1 druh do Trebouxiophyceae a čtvrtý do Chlorophyceae. (Buchheim a kol., 1990) dokonce ukázal, že ani rod *Chlamydomonas* není monofyletický. Druhy z rodu *Chlorococum* byly rozděleny do Chlamydomonadales a Ulvophyceae (Watanabe a kol., 2001; Krienitz a kol., 2003). Molekulární data poskytla důkazy o konvergentní evoluci morfologie v mnoha znacích používaných k rozlišení rodů jednobuněčných zelených řas. Výsledky těchto studií jen zdůrazňují nutnost dalšího molekulárního zkoumání, zejména při odkrývání fylogenetických vztahů v rámci Chlorophyceae.

3.2. Trebouxiophyceae

Tato poměrně nedávno vytvořená skupina (dříve nazývána Pleurastrophyceae) je co do organizace stélky a ekologie velmi rozmanitá. Zahrnuje druhy jednobuněčné kokální, bičíkaté, vláknité i koloniální. Nacházejí se zde druhy žijící v symbióze s lišejníky (*Trebouxia*), nesmírně široký rod *Chlorella* zahrnující půdní i sladkovodní druhy, pikoplanktonní *Nannochloris*, koloniální *Dictyosphaerium*; *Prasiola*, která vytváří rozměrné jednovrstevné povlaky na vlhké půdě a má velký ekologický význam v polárních oblastech (*P. crispera*), kde je jedním z výrazných producentů biomasy, *Botryococcus* – jediná zelená řasa vytvářející vodní květ a další. Členové Trebouxiophyceae se rozmnožují nepohlavně prostřednictvím autospor nebo zoospor. Pohlavní rozmnožování nebylo u těchto řas pozorováno. Tato třída začala být uznávána teprve nedávno a neustále se ukazuje, že do ní spadají nové a nové rody. Stavbou stélek, způsobem rozmnožování i ekologií jsou od sebe značně odlišné.

Mattox a Stewart (1984) ve své klasifikaci umístili sladkovodní řasy CCW typu (zelené řasy, u kterých poloha bazálních tělísek jejich bičíků odpovídá pohybu proti směru hodinových ručiček) do třídy Pleurastrophyceae. Tato třída obsahovala jednobuněčné *Pleurastrum* a *Trebouxii*, jednobuněčnou bičíkatou *Tetraselmis* a rozvětvený vláknitý *Microthamnion*. Naopak Melkonian (1990a) zařadil tyto řasy (s výjimkou *Tetraselmis*) do samostatného řádu Microthamniales. O monofýlii skupiny Pleurastrophyceae poskytla důkazy molekulární analýza založená na několika taxonech (Kantz a kol., 1990). Friedl a Zeltner (1994) a Friedl (1995) s použitím 18S rDNA dat prokázali, že *Pleurastrum insigne*, podle něhož byla třída Pleurastrophyceae nazvána, ve skutečnosti patří do Chlorophyceae. Navíc Friedl svou molekulární studií poskytl důkazy, které vedly k vytvoření nové skupiny Trebouxiophyceae, do níž bylo přesunuto mnoho taxonů, které byly dříve v Pleurastrophyceae. Současné rozšiřování třídy Trebouxiophyceae bylo nastartováno právě fylogenetickými studiemi, které prokazují, že

tato skupina je monofyletická a že se její příslušníci výrazně geneticky odlišují od CCW typů ze třídy Chlorophyceae (Lewis a McCourt, 2004).

3.3. Ulvophyceae

Ulvophyceae jsou morfologicky i ekologicky různorodá skupina. Jedná se převážně o mořské druhy, mezi nejznámější zástupce patří *Ulva* známá jako mořský salát (Hayden a Waaland, 2002), *Codium* (Goff a kol., 1992), *Caulerpa* (Meinesz, 1999) nebo modelový organismus *Acetabularia* (Mandoli, 1998), ze sladkovodních patří k nejznámějším *Cladophora*. Členové řádu Trentepohliales jsou terestriční. Buňky jsou vybaveny dvěma nebo čtyřmi bičíky, bazální tělíska mají čtyři kořeny mikrotubulů uspořádané do kříže. Stélky jsou převážně heterotrichální vlákna, najdeme zde však i listovité nebo složitější sifonální a sifonokladální stélky. Větší část zástupců jsou mnohojaderné organismy. Většina skupin má diplobiontický životní cyklus. Z trojice blízce příbuzných Ulvophyceae-Trebouxiophyceae-Chlorophyceae se Ulvophyceae odštěpily jako první, potvrzují to výsledky sekvenování 18S rDNA (Mishler a kol., 1994) i šupinatý kryt jejich bičíkatých stádií, který připomíná Prasinophyceae. Navíc obsahují často xanthofyly siphonin a siphonoxanthin, které mají společné s Prasinophyceae, ale které už Trebouxiophyceae a Chlorophyceae ztratily (Fawley a Lee, 1990; Sym a Pienaar, 1993).

4. rod *Chlorella*

Jméno *Chlorella* je řeckolatinského původu, bylo odvozeno z řeckého slova “*chloros*”, což znamená zelený, a latinské zdobňující přípony “*ella*”. *Chlorella* (zelenivka) je rod jednobuněčných zelených řas patřící do kmene Chlorophyta. Buňky jsou samostatné, nejčastěji kulovitého tvaru o velikosti 2 až 10 µm v průměru. Při mikroskopickém pozorování uvidíme většinou laločnatý chloroplast, pyrenoid a hladkou buněčnou stěnu (Nakahara a kol., 2003; Luo, 2006) Zástupce rodu *Chlorella* nejčastěji najdeme v půdě a ve sladkých vodách, mohou však být i endosymbionty hub, prvoků a bezobratlých. *Chlorella* stejně jako mnoho dalších jednobuněčných eukaryot obsahuje fotosyntetické organely zvané primární plastidy. Primární plastid je podobně jako mitochondrie prokaryotického původu a vznikl pohlčením sinice heterotrofním eukaryotem v procesu zvaném primární endosymbióza. Tato událost měla za následek vznik tří odlišných skupin fotosyntetických eukaryot s primárním plastidem (Chlorophyta, Rhodophyta a Glaucocystophyta), všechny dohromady označované jako Archaeplastida (Palmer, 2003; Rodriguez-Ezpelenta, 2005; Oborník a kol., 2009). Plastid těchto skupin obsahuje chlorofyly *a* a *b*, je obklopen dvěma membránami a obsahuje vlastní

genom (redukovaný genom pohlcené sinice). Plastidové geny kódují procesy související s jeho metabolismem. Mnoho genů současných plastidů bylo translokováno do jádra prostřednictvím endosymbiotického genového transferu (EGT). Tyto geny jsou exprimovány v cytoplazmě a jejich produkty jsou cílené zpátky do plastidu díky speciální targetovací sekvenci na N-konci cíleného proteinu (Palmer, 2003; Soll a Schleiff, 2004; Oborník a kol., 2009).

Zástupci rodu *Chlorella* patří mezi nejlépe prostudované zelené řasy. Od roku 1919, kdy Warburg seznámil svět s kulturami této řasy jako vhodným objektem pro základní výzkum, začaly tyto řasy sloužit jako modelové organismy pro průkopnické studie v rostlinné fyziologii a biochemii např. při studiu fotosyntézy. Významnou roli sehrála chlorela také při studiu redukce dusičnanů (Kessler, 1953; Falkowski a Raven, 1997). Nyní má chlorela široké uplatnění v oblasti zemědělství a biotechnologie, slouží jako krmivo pro zvířata a i jako na proteiny bohatá potrava či součást potravinových doplňků pro lidi. Další uplatnění najde např. v čištění odpadních vod, v systémech výměny plynů apod. (de-Bashan a kol., 2007) Extraktům z chlorely byly dokonce připisovány protinádorové (Konishi a kol., 1985; Miyazawa a kol., 1988) a antimikrobiální účinky (Tanaka a kol., 1986). Nedostatek zřejmých morfologických znaků spolu s výhradně nepohlavním reprodukčním cyklem prostřednictvím autospor představuje u druhů rodu *Chlorella* značný problém při taxonomickém popisu a jejich klasifikaci a identifikaci (Kessler a Huss, 1992). Avšak výběr vhodného kmene nebo druhu je rozhodující pro mnohé z výše uvedených aplikací (Kessler, 1982, 1986; Kessler a kol., 1997). V minulosti byla k taxonomii chlorel použita celá řada metod. Mnoho z nich bylo založeno na nutričních požadavcích, kdy byly jednotlivé kmeny kultivovány za autotrofních nebo heterotrofních podmínek (Shihira a Krauss, 1965). DaSilva a Gyllenberg (1972) ve své monografii o rodu *Chlorella* Fott a Nováková (1969) kombinovali morfologické a strukturní znaky s některými fyziologickými charakteristikami. Popsali 9 druhů a 6 kmenů. Další autoři využívali pro identifikaci a klasifikaci serologické kros-reakce (Sanders a kol., 1971; Kümmel a Kessler, 1980). Další klasifikační metoda je založena na ultrastruktuře a chemickém složení buněčné stěny (Yamada a Sakaguchi, 1982; Takeda, 1991, 1996) a ultrastruktuře pyrenoidu (Ikeda a Takeda, 1995). Jako nejvíce uznávaná a prakticky proveditelná metoda pro vymezení druhů v rodu *Chlorella* se ukázala chemotaxonomická klasifikace kombinující biochemické a fyziologické znaky (Kessler a Soeder, 1962; Kessler, 1992). Tato práce vedla k charakterizaci 19 taxonů, z nichž některé vykazovaly výrazné rozdíly. Další významné rody zelených řas jako *Scenedesmus* a *Ankistrodesmus* se jevíly fyziologicky a biochemicky mnohem jednodušší (Hellmann a Kessler, 1974b). Tyto výsledky naznačují významnou různorodost uvnitř rodu *Chlorella*. Pro sledování fylogenetických vztahů jsou nepostradatelné srovnávací studie

nukleových kyselin. Předchozí práce na složení DNA odhalily překvapivě široký rozsah v zastoupení guaninu a cytosinu (44 - 75%). Tato různorodost byla následně potvrzena rozsáhlou kvantitativní DNA/DNA hybridizací (Kerfin a Kessler, 1978). DNA/DNA hybridizace umožňuje detekci blízce příbuzných druhů (srov. Schleifer a Stackebrandt, 1983), (Huss a kol. 1988, 1989a,b; Kapraun 2007).

Tento nesmírně široký rod potřebuje revizi, protože se pomocí sekvenování zjistilo, že některé druhy patří do skupiny Trebouxiophyceae (*Chlorella kessleri*, *C. saccharophila*, *C. minutissima*, *C. ellipsoidea*, *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*), ale např. *C. fusca* skutečně patří do Chlorophyceae (Fiedl, 1995). Z těchto a biochemických analýz (Takeda, 1991) také vyplynulo, že celý rod je značně polyfyletický (např. Booton a kol., 2002, Elster a kol., 2004). Byly z něj vyčleněny dva další rody – *Prototheca* (Ueno a kol., 2006), parazitická řasa napadající živočichy i rostliny (Pore a kol., 1983) a elipsoidní druhy s jednovrstevnou stěnou bez pyrenoidů jako je *Watanabea* (Hanagata a kol., 1998). Rozšířená studie zjistila mezidruhové vztahy mezi *C. vulgaris* a *C. sorokiniana* (Huss a kol., 1989a; Krienitz a kol., 2004). Oba druhy jsou morfologicky identické, liší se aktivitou hydrogenázy a termofilí u *C. sorokiniana* (Kessler, 1982). Překvapivě podobně úzký vztah byl zjištěn u tří kmenů *C. fusca* a druhy morfologicky odlišného rodu *Scenedesmus*. Byl tedy navržen možný vztah mezi *C. fusca* a *Scenedesmus*. Na základě submikroskopické struktury buněčné stěny Fott a kol., (1975) rozpoznal pouze kmen *C. fusca fusca* jako jednobuněčného člena rodu *Scenedesmus* (později popsán jako *S. abundans* podle Hegewalda a Schnepfa (1991), zatímco u zbývajících dvou kmenů *C. fusca* (*vacuolata* a *rubescens*) nebyl tento vztah uznán. K odhalení vztahů mezi druhy chlorel a určení jejich fylogenetické pozice v rámci Chlorophyta jsou obzvláště přínosné srovnávací analýzy sekvencí konzervovaných genů, jako např. 18S rRNA. Předchozí práce založené na tomto genu podporují navrhovanou heterogenitu rodu *Chlorella* (Huss a Sogin, 1990) a také ukázaly, že tři bývalé kmeny *C. fusca* jsou různé druhy rodu *Scenedesmus* (Kessler a kol., 1997).

4. 1. Role chlorely ve studiu fotosyntézy

Fotosyntéza představuje nepostradatelný způsob vlastní tvorby organických látek. Provozují ji vyšší rostliny, zelené a hnědé řasy a některé sinice a bakterie. Jedná se o soubor chemických reakcí, v jejichž průběhu dochází k pohlcování energie slunečního záření, která je využita k přeměně jednoduchých anorganických látek (CO₂ a H₂O) na složité organické látky (cukry). V průběhu fotosyntézy při fotolýze vody vzniká jako vedlejší produkt kyslík. Fotosyntéza je z hlediska existence života pokládána za jeden z nejdůležitějších biochemických

procesů, ne-li vůbec ten nejdůležitější. Organické látky vytvářené při fotosyntéze spotřebovávají heterotrofní organismy, mezi které patří i člověk. Za práci o fixaci uhlíku ve fotosyntéze byla v r. 1962 M. Calvinovi udělena Nobelova cena. Calvin zjistil, že oxid uhličitý vstupuje do organické vazby a redukuje se v pentosovém cyklu, známém po svém objeviteli jako Calvinův cyklus. Melvin Calvin se spolupracovníky A.A. Bensonem a J.A. Basshamem v padesátých letech s použitím isotopem značeného $^{14}\text{CO}_2$ vystopovali sled těchto reakcí (cestu oxidu uhličitého) ve fotosyntéze. Radioaktivní $^{14}\text{CO}_2$ byl jednou z podmínek, aby se složitý sled reakcí dal analyzovat. Druhou byla papírová chromatografie, která umožnila dělit rychle a spolehlivě produkty asimilačních reakcí. Calvin se spolupracovníky použili kultury řasy *Chlorella* v aparatuře, která umožňovala rychlé zavedení $^{14}\text{CO}_2$ a rychlý (v sekundových intervalech) odběr vzorku a jeho usmrcení ve vroucím alkoholu (Calvin a kol., 1950; Bassham a Calvin, 1957).

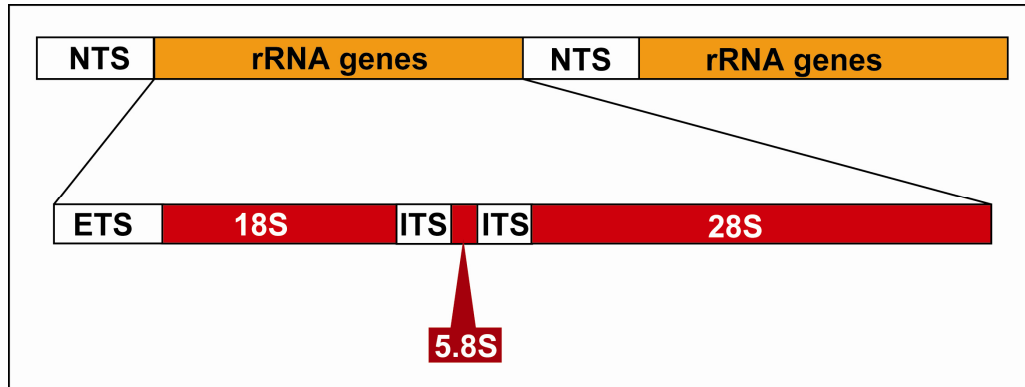
5. Studované geny

5.1. Ribozomální DNA (rDNA)

Ribozomální DNA (rDNA) je význačnou a nesmírně důležitou součástí každého eukaryotního genomu. Obsahuje desítky až stovky tandemově uspořádaných kopií genů kódujících tři hlavní ribosomální RNA (rRNA). Tyto rRNA jsou nezbytnou součástí ribosomu, který hraje klíčovou roli v procesu překlada genetické informace z mRNA do proteinu. Na chromosomech je rDNA lokalizována v oblasti, která je označována jako organizátor jadérka ("nucleolar organizer region", NOR) a která je zodpovědná za formování jadérka (Lam a kol., 2005; Raška a kol., 2006). Různé části rDNA se vyvíjejí různou rychlostí, což umožňuje jejich široké využití ve fylogenetických studiích. Ribozomální DNA může poskytnout informativní data k řešení téměř všech systematických otázek. Nejstudovanější je gen pro 18S rRNA, který patří k nejpomaleji se měnícím sekvencím vůbec. Proto je velmi užitečný pro zkoumání prekambrijských evolučních událostí, jakými jsou např. vztahy mezi mnohobuněčnými organismy na úrovni kmenů a tříd (Hillis a Dixon, 1991, Hemmrich a kol., 2007). rDNA se skládá z velké a malé podjednotky, mezi nimiž se nacházejí transkribované spacery. Oblasti 28S, 5.8S, 5S tvoří velkou podjednotku, oblast 18S tvoří malou podjednotku (Alberts a kol., 2002), která byla v této práci analyzována u třech kmenů chlorelly. Schéma rDNA je znázorněno obr. 2

5.2. ITS (internal transcribed spacer)

Často používaným markerem pro rozlišení a identifikaci druhů je mezerník ITS1. Tato nekódující, ale transkribovaná sekvence se nachází mezi konzervovanými úseky kódujícími podjednotky 18S a 5.8S ribosomální RNA (obr. 2). Vykazuje rychlejší evoluci než většina



Obr.2: Uspořádání eukaryotické 18S, 5.8S a 28S rDNA v tandemově opakujícím se klastru, (5S rDNA je kódována samostatně) NTS - netranskribovaný spacer, ETS - vnější transkribovaný spacer, ITS - vnitřní transkribovaný spacer

jiných genů, může se tedy značně lišit i mezi blízce příbuznými druhy. Z tohoto důvodu obsahuje velké množství polymorfických pozic, které jsou primárně způsobeny variabilním počtem jednoduchých opakujících se jednotek mezigenových oblastí. Díky tomuto DNA polymorfismu můžeme organismy rozdělit i do těch nejnižších taxonomických úrovní (např. Baldwin, 1992; Douglas a kol., 2001).

5.3. Plastidová DNA (pDNA)

V buňce bývá přítomno více kopií plastidové DNA, která je vždy kruhová (Howe a kol., 2003; Bendich, 2004). Velikost pDNA je velice rozmanitá, přičemž redukované plastidové genomy se nacházejí zejména u druhů, jejichž plastidy ztratily fotosyntetickou funkci (např. parazitická řasa *Helicosporidium* či *apicomplexa*) (de Koning a Keeling, 2006). Rovněž počet plně funkčních genů je velice rozmanitý. Řádově obsahuje jedna molekula pDNA několik desítek či stovek genů (Alberts a kol., 2002).

V této práci byla charakterizována malá podjednotka (16S rDNA), která se používá stejně jako 18S rDNA ke zkoumání příbuzenských vztahů napříč všemi taxonomickými kategoriemi. (např. Hillis a Dixon, 1991; Friedl, 1995; Oborník a kol., 2002; Moore a kol., 2008 a další).

B. Cíl práce

- 1) Určit fylogenetickou a taxonomickou pozici tří produkčních kmenů rodu *Chlorella* na základě fylogenetické analýzy molekulárních dat.
- 2) Molekulárně charakterizovat tři produkční kmeny řas rodu *Chlorella* používané v řasových biotechnologiích s cílem vytvořit identifikační systém pro jejich nezaměnitelnou patentovou ochranu.

C. Materiály a metody

1. Použité kmeny

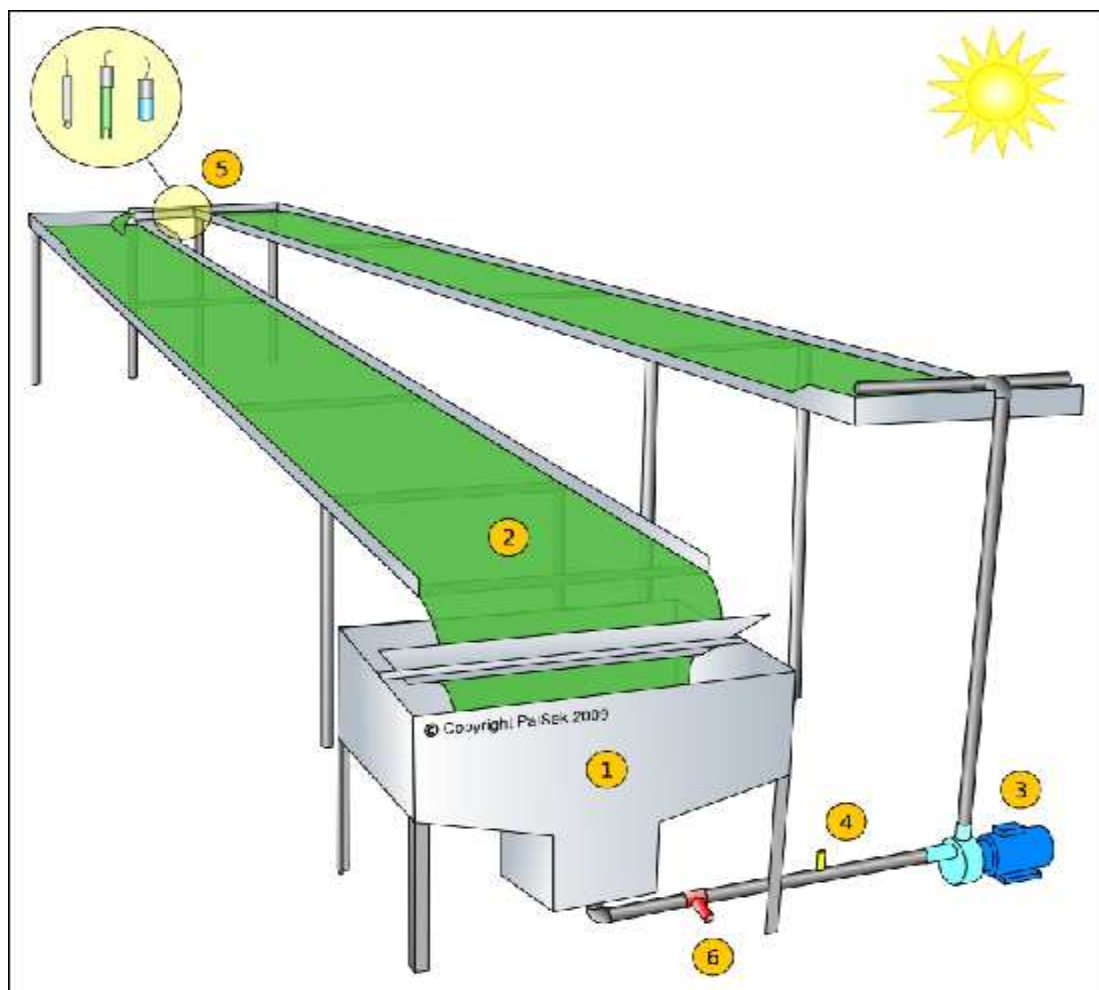
V této práci jsem pracoval se třemi kmeny řas rodu *Chlorella* sp. Dva z nich jsou heterotrofní (H1 a H2) a jeden autotrofní (A1). Větší pozornost byla věnována oběma kmenům získaným z Laboratoře řasových biotechnologií Mikrobiologického ústavu AV ČR (Třeboň, Česká republika), konkrétně se jedná o kmeny H1 a A1. Třetí kmen získala Laboratoř řasových biotechnologií z Polska. Tento kmen (H2) je také heterotrofní a jeho zvláštností je, že obsahuje pouze lutein a žádný chlorofyl. Řasa má tedy výraznou žlutou barvu. Nyní bych se podrobněji zmínil o dvou třeboňských kmenech, zejména jejich kultivaci a využití.

U autotrofního kmene (pro náš účel označen jako A1) je velkobjemová produkční kultivace závislá na počasí (30 - 35 °C) a je možná pouze v létě. Tato chlorella je pěstována ke komerčním účelům, používá se jako doplněk zdravé výživy pro lidi (vyrábí HM Harmonie, s. r. o). Heterotrofní kmen se kultivuje v železných fermentorech, jako medium slouží glukóza, pH se pohybuje kolem 7. Kvalita biomasy není tak dobrá jako v případě autotrofního kmene, obsahuje vyšší počet bakterií než povoluje stanovený limit, proto se tato chlorella využívá jako přísada do krmných směsí pro zvířata. Výhodou je, že produkce tohoto kmene není závislá na počasí. Výraznou nevýhodou je pak zvýšená energetická náročnost.

2. Kultivační systém pro autotrofní kmen

Ke kultivaci autotrofního kmene chlorelly byly použity dva typy venkovních otevřených soustav: experimentální jednotka 24 m² s nastavitelným objemem (min. 0,17 m³) a produkční jednotka s parametry 224 m² a objemem 2,2 m³. V těchto jednotkách protéká suspenze řas v tenké vrstvě (6 mm) přes kaskádu nakloněných rovin vystavených slunečnímu záření (Lívanský a Doucha, 2006). Jednotka se skládá z pěti částí: a) kultivační plochy, b) odplyňovacího zařízení (degasser), c) čerpadla, d) přívodu CO₂ a e) měřících a regulačních senzorů. Experimentální jednotka se skládá ze dvou šikmých kultivačních ploch, kde je níže položený konec první plochy korytem napojený k výše položenému konci druhé plochy, která je zešikmena v opačném směru (obr. 2). Suspenze natéká do retenční nádrže (degasser), odkud je pomocí čerpadla přečerpávána zpět do horní části kultivačního zařízení. Takto suspenze koluje dokud nedosáhne potřebné hustoty buněk. Speciální software (založen na LabView, National Instruments) byl navržen tak, aby umožnil automatické řízení experimentální jednotky, získávání dat během kultivace a sledování parametrů kultivace řasové kultury v této jednotce. Průběh růstu kultury byl sledován senzory měřícími teplotu, pH a koncentraci

rozpuštěného kyslíku. Dodávky CO₂ byly řízeny elektronickým ventilem v závislosti na pH. Produkční jednotka 224 m² (S / V = 102 m⁻¹) je asi 8 krát větší než je experimentální jednotka. Skládá se ze dvou symetrických polovin, z nichž každá se skládá ze 4 ploch běžících paralelně dopředu a dozadu (Masojídek, osobní sdělení).



Obrázek 2. schéma kultivačního zařízení pro autotrofní kmen. 1) retenční nádrž (degasser), 2) kultivační plocha, 3) čerpadlo, 4) přívod CO₂, 5) měřící a regulační senzory, 6) výpusť suspenze (Lívanský a Doucha, 2006)

3. Podmínky kultivace autotrofního kmene

Experimenty byly prováděny s řasou *Chlorella* sp. pocházející z kultury Laboratoře řasových biotechnologií mikrobiologického ústavu AV ČR (Třeboň, Česká republika). Její laboratorní optimální růst je asi při teplotě 30 °C, ale je schopna růst až do teplot 35 - 37 °C bez citelného snížení produktivity. Většina měření byla provedena mezi 7:00 a 19:00 h v jasných

slunečných dnech v červnu a v červenci se stabilní dávkou slunečního záření. Denní kultivační období bylo stanoveno zapnutím a vypnutím systému, zatímco při pěstování přes noc nebo za nepříznivého počasí byla suspenze držena v retenční nádrži a probublávána vzduchem. Kultury byly pěstovány fotoautotrofně na minerálním médiu (Doucha a Lívanský, 1995). Živiny byly dodávány dvakrát denně v závislosti na spotřebě kultury. pH bylo udržováno na optimální hodnotě $7,6 \pm 0,2$ automatickým vstřikováním čistého CO₂. Teplota se pohybovala mezi 22 °C a 36 °C. V ranních hodinách (8:00 h) byla intenzita slunečního záření asi 0,4 mmol fotonu/m²s, zatímco v poledne (13:00 h) intenzita slunečního záření dosáhla až 2 mmol fotonu/m² s. Na začátku experimentu byly kultury obohacovány čerstvým médiem, až biomasa dosáhla požadované hustoty. V 8:00 byla naměřena koncentrace rozpuštěného kyslíku asi 12 mg/l, vrcholu dosáhla v poledne, 25-30 mg/l (Masojídek, osobní sdělení). Za optimálních podmínek dosahuje výnosnost tohoto kmene cca 40 a 45 g suché hmoty řas/l média.

4. Podmínky kultivace heterotrofního kmene

Následující pasáž o rozsahu cca půl stránky obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

5. Izolace DNA

Buňky z kultury byly umístěny do 1,5 ml zkumavky a centrifugovány 5 minut v 13000 rpm ($g = 20000 \text{ m/s}^2$), poté k nim bylo přidáno 100 μl lyzačního činidla SET (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris (pH=8.0) a byly homogenizovány s křemičitými kuličkami (silica beads 0,5 mm). K homogenizované směsi bylo přidáno dalších 300 μl lyzačního činidla SET a 100 μl

proteiny K (20 mg/ml). Takto připravená směs byla inkubována přes noc v 56 °C. Poté se nechala reakce stát 5 minut na ledu a byla centrifugována 5 minut v 13000 rpm ($g = 20000 \text{ m/s}^2$). Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky, pelet byl odstraněn. Lyzát byl doplněn ddH₂O do 600 µl a byl přidán stejný objem fenolu. Objem zkumavky byl důkladně, ale šetrně zamíchán převrácením. Po následné centrifugaci se ve zkumavce objevily 2 fáze. Vyšší fáze byla přemístěna do nové zkumavky, doplněna stejným množstvím fenolu a centrifugována. Tento krok byl opakován dokud nebyla horní fáze průhledná. Purifikovaná vodná fáze byla přenesena do nové zkumavky a smíchána se stejným množstvím fenolu a chloroformu v poměru 1:1. Po následném promíchání a centrifugaci byla horní fáze přenesena do nové zkumavky a smíchána s chloroformem (1:1). Po promíchání a centrifugaci byla horní fáze přenesena do nové zkumavky a přidán 96 % ethanol (1:3). Pak byla zkumavka inkubována 1,5 hodiny v - 80 °C. Po inkubaci následovala chlazená centrifugace v 4 °C a 14000 rpm ($g = 20600 \text{ m/s}^2$) po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a přidán 1 ml 70% ethanolu. Po následné 10 m centrifugaci, za stejných podmínek jako v předchozím kroku, byl odstraněn supernatant a zkumavky s peletem byla umístěna na cca 20 minut do termoboxu k vysušení (37 °C). Poté bylo přidáno 50 µl ddH₂O, resuspendováno a zamraženo - 20 °C. (Sambrook a kol., 1989)

6. Amplifikace požadovaných úseků DNA

K amplifikaci požadovaného úseku DNA byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR). Směs pro PCR se skládala z: 2,5 µl 10x Taq PCR bufferu, 0,5 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl (25 nmol) primerů, 0,2 Taq DNA polymerázy (1U/ µl), (Top-Bio s.r.o). 1 µl (50-200 ng/ µl) DNA, 19,8 µl ddH₂O. DNA byla amplifikována v T3 Thermocycleru (Biometra). Při testování nasedací teploty specifických primerů byl použit cycler s gradientem MJ Mini (Bio-Rad). Malá jaderná podjednotka (18S rDNA) byla amplifikována z genomové DNA. Amplifikační program se skládal z počáteční denaturace 95 °C 3 minuty a 32 cyklů s nastavenými parametry: 94 °C 45 sek, 52 °C 45 sek a 72 °C 1 minutu. Program byl ukončen závěrečnou elongací 72 °C 10 minut. Amplifikace malé plastidové podjednotky (16S rDNA) a jaderného ITS1 (internal transcribed spacer) proběhla stejně jako při amplifikaci 18S rDNA. Jediným rozdílem byla odlišná nasedací teplota primerů. V případě malé plastid. podjednotky 46 °C a u ITS1 50 °C. Nasedací teplota specificky navržených primerů pro jednotlivé kmeny chlorelly (viz. dále) byla ve všech případech 50 °C. Seznam primerů použitých v této práci je uveden v tabulce 2). Fragmenty DNA amplifikované pomocí PCR byly separovány elektroforézou. Vzorky byly analyzovány na 1% (w/v)

agarózovém gelu. K určení velikostí fragmentů byl použit 2-Log DNA ladder (New England Biolabs, Inc.) sloužící jako molekulární marker. Produkty byly detekovány na UV transiluminátoru (TFX-35.M Vilber Lourmat). Fotografie gelu byly pořízeny digitální kamerou (Kodak) a zpracované softwarem Kodak Digital science 1D verze 3.0.2.

název	gen	sekvence 5'-3'
NS1	18S rDNA	GTAGTCATATGCTTGTCTC (Wu a kol., 2001)
NS2	18S rDNA	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC (Wu a kol., 2001)
CS1	16S rDNA	CGGCGTATTAGCTTGTGG (Wu a kol., 2001)
CS2	16S rDNA	GAGTGCTTTCGCCTTTGG (Wu a kol., 2001)
M13F	sekvenační	GTAAAACGACGGCCAG
M13R	sekvenační	CAGGAAACAGCTATGAC
Het1	ITS1	Následující pasáž obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.
Het2	ITS1	
Aut1	ITS1	
Aut2	ITS1	
Chlo1	ITS1	
Chlo2	ITS1	
SSUF	18S rDNA	
SSUR	18S rDNA	CTTTAAGTTTCAGCCTTGCGAC
SSU1F	18S rDNA	GGCACCTTATGAGAAATCAAAG
SSU1R	18S rDNA	ATCCGAACACTTCACCAGCACAC
ITS1R	ITS1	GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG (Huss a kol., 2002)
ITS1F	ITS1	ATCCTGCAATTCACACCAAGTATCG (Huss a kol., 2002)

Tabulka 2. Seznam použitých primerů

7. Ligace PCR fragmentů

Ligace byla provedena pomocí pGEM-Teasy Vector System II firmy Promega. Ligační směs obsahovala: 0,5 µl pGEM –T Easy plazmidu (50 ng/µl), 1,5 µl PCR produktu, 0,5 µl enzymu ligázy (3 U/µl), 2,5 µl 10x ligačního pufru a takto připravena byla inkubována přes noc při 4 °C. Pokud se na gelu objevilo více proužků, bylo třeba zkoumaný fragment z gelu vyříznout a a extrahovat DNA podle kitu QIA quick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). Teprve potom byla DNA použita k ligaci.

8. Transformace bakterií a testování přítomnosti inzertu

K ligační směsi bylo přidáno 50 μ l na ledu rozmražených chemicky kompetentních buněk. Takto připravená reakce byla inkubována 30 minut na ledu. Poté následoval heat-shock (30 sekund v 42 °C), okamžité zchlazení na ledu (2 minuty) a přidání 200 μ l vytemperovaného SOC média. Zkumavka se směsí byla 1 hodinu inkubována v třepačce (220 rpm; 37 °C). Pak byly kompetentní buňky přeneseny na předeřháté agarové Petriho misky a rovnoměrně rozetřeny po jejich povrchu. Před vysetím bylo na povrch misek naneseo 30 μ l X-galu (30 mg/ml) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid, Serva) a 4 μ l IPTG (isopropyl thiogalaktosid). Misky byly inkubovány 14 – 16 hodin v 37 °C. Po inkubaci vyrostly na gelu modré a bílé kolonie bakterií. Bílé kolonie s vysokou pravděpodobností obsahovaly vektor, který v sobě měl náš PCR produkt. Principem výskytu modrých a bílých kolonií je tzv. modrobílá selekce. Vektor obsahuje gen *lacZ* kódující β -galaktosidázu, na jejíž aktivitě je systém založen. Tento enzym štěpí fyziologicky disacharid galaktózu na laktózu a glukózu. Pro sledování aktivity tohoto enzymu se používá umělý substrát X-gal. Tento substrát je bezbarvý, ale jeho štěpením vzniká modrý produkt. Obsahuje-li agarová miska X-gal a na tuto půdu vysejeme bakterie obsahující funkční β -galaktosidázu, budou z média získávat X-gal, štěpit ho a jejich kolonie se zbarví zřetelně modře. Pokud nebudou obsahovat β -galaktosidázu, zůstanou krémově bílé. Pokud se podaří vložit cizí DNA do klonovacího místa, naruší se tím gen pro beta-galaktosidázu ve vektoru a po vpravení vektoru do bakterie zůstanou kolonie bakterií bílé - aktivita β -galaktosidázy nebude dodáním vektoru obnovena. Pokud se nepodaří cizí DNA do vektoru vložit a vektor se při ligaci znovu uzavře, obnoví se tím funkční gen pro beta-galaktosidázu a po vpravení vektoru do bakterie její kolonie zmodrají. IPTG slouží jako induktor exprese genu *lacZ*.

9. Izolace plazmidů z pozitivních klonů

Bílé kolonie byly přeneseny sterilní špičkou do 3 ml LB média obsahujícího 12 μ l ampicilinu (12.5 μ g/ml) a kultivovány přes noc v 37 °C za stálého třepání (220 rpm). Bakteriální buňky obsahující plazmid byly přeneseny do 1,5 ml zkumavky a centrifugovány (1min., 13000 rpm), supernatant byl odstraněn. Plazmid obsahující PCR inzert byl izolován dle návodu kitu QIA prep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Plazmidy byly vymyty 30 μ l ddH₂O a uchovávány v -20°C. Koncentrace získaného plazmidu byla zjištěna pomocí spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf) při vlnové délce 260 nm. Před přípravou sekvenační reakce byly vyizolované plasmidy testovány na přítomnost inzertu restriční analýzou.

Směs pro restrikci byla připravena takto: 1 μ l EcoR1, 1 μ l EcoR1 bufferu, 3 μ l ddH₂O, 5 μ l plasmidové DNA. Směs byla 1,5 hodiny inkubována v 37 °C. Plasmidy byly separovány elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Po vystavení gelu UV záření bylo možno pozorovat 2 pruhy. První ukazoval velikost plasmidu bez vyštípnutého inzertu a druhý velikost inzertu.

10. Enzymatické čištění

V případě, že se po elektroforéze objevil na gelu jediný proužek (fragment DNA), bylo možné sekvenovat tento fragment přímo z PCR produktu bez klonování do plasmidu, ale nejprve bylo nutné tento PCR fragment přechistit. Směs připravená k enzymatickému čištění se skládala z 15 μ l PCR produktu, 1 μ l SAP (shrimp alkaline phosphatase) a 1,5 μ l Exonukleázy I ředěné 1/10 v Dill Bufferu (50 mM TRIS-HCl (pH 8,0)). Takto namíchaná reakce se byla umístěna do cycleru a spuštěn program CLEANUP s parametry 37 °C 30 min (optimální teplota, při které enzym funguje), 80 °C 15 min (inaktivace enzymu, denaturace).

11. Příprava sekvenční reakce

DNA fragment pro sekvenování je možné získat dvěma způsoby, a to buď přímo z PCR produktu, který byl enzymaticky pročištěn (viz. výše) nebo pomnožením DNA fragmentu ve vektoru, v našem případě slouží jak vektor plasmid. Sekvenční reakce byla namíchána v 200 μ l zkumavkách. Objem zkumavky pro sekvenční reakci činil 7,5 μ l. Sekvenční směs: 0,5 μ l primeru, 75-150 ng plasmid DNA, množství DNA z PCR produktu závisí na velikosti fragmentu DNA, v našem případě se jednalo o fragmenty 500– 1000 pb, čemuž odpovídá 5-15 ng DNA, reakce byla doplněna ddH₂O na objem 7,5 μ l. V případě sekvenace plasmidu byl použit primer M13R nebo M13F (Tab. 2), pokud byla DNA sekvenována z PCR produktu, byl použit jeden z primerů figurující v amplifikační reakci. Sekvenace provádí Laboratoř genomiky BC AV ČR, v. v. i., v Českých Budějovicích na přístroji ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems.

12. Navrhování kmenově-specifických primerů pro PCR diagnostiku

Každý validní taxon by mělo být možné identifikovat metodami molekulární biologie. V ideálním případě mohou být navrženy specifické primery a pak lze tento taxon diagnostikovat jedinou PCR reakcí s použitím těchto primerů. V této práci byly specifické primery pro tři kmeny chlorelly navrhovány na základě sekvence ITS1. Prvním krokem bylo sestavení alignmentu, který obsahoval nejvíce příbuzné homology sekvencí zkoumaným

třem kmenům chlorelly. Homology byly vyhledány funkcí BLAST v databázi NCBI. Poté byly z oblastí specifických pro jednotlivé kmeny navrženy primery.

Následující pasáž obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Obr. 3a. Multiple alignment oblasti ITS1. Označené sekvence ukazují specifické oblasti, ze kterých byly navrženy primery Het1, Aut1, Chlo1 (forward 5'-3') pro jednotlivé kmeny chlorel (tab. 2).

Následující pasáž obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

Obr. 3b. Multiple alignment oblasti ITS1. Z označených sekvencí byly navrženy reverzní primery (5'-3') Het2, Aut2, Chlo2 (tab. 2)

13. Zpracování dat

Data ze sekvenátoru byla dodatečně editována pro jejich následnou analýzu. V případě, že byla DNA zaklonována do plasmidu, byly spolu s hledanou sekvencí DNA osekvenovány i části vektoru. Tyto části byly identifikovány v NCBI (Screen sequence for vector contamination (vecscreen)) a následně odstraněny v programu EditSeq (DNASStar). Identifikace upravených sekvencí byla provedena s použitím databáze NCBI BlastSearch

[\(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Z homologů, které se nejvíce podobaly identifikované sekvenci, byl sestaven dataset. Nukleotidové datasey byly alignovány v programu BioEdit (Hall, 2005) užitím algoritmu Clustal W a poté upraveny pro fylogenetickou analýzu. Nejednoznačné pozice a mezery byly vyloučeny z další analýzy. Seznam organismů užitých v analýze a jejich GenBank accession numbers pro 18S rDNA, pro 16S rDNA a ITS1 jsou uvedeny v příloze (tabulky 1, 2, 3).

14. Fylogenetické analýzy

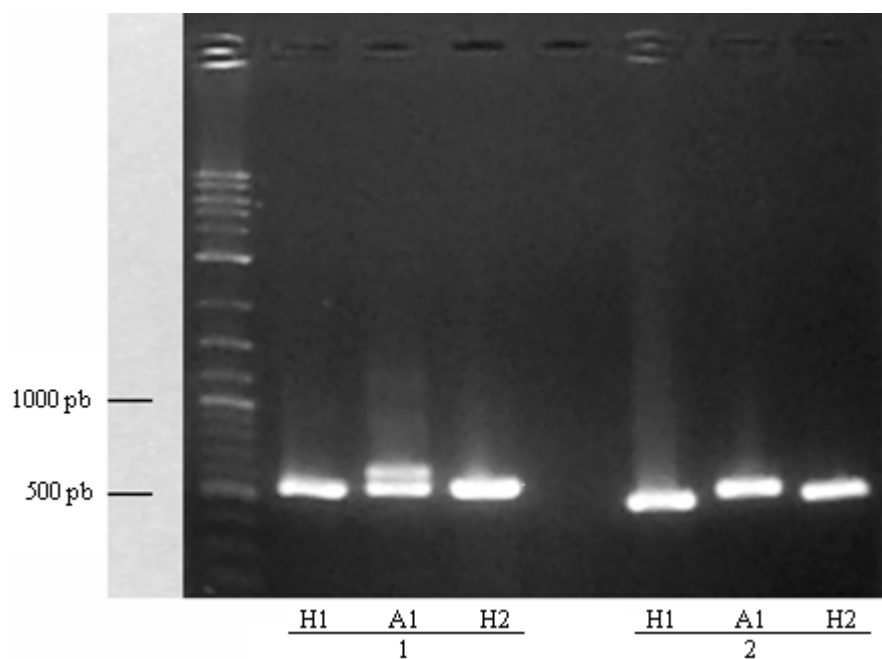
Vytvořené datasey byly analyzovány metodami maximální parsimonie (Maximum Parsimony MP), maximální věrohodnosti (Maximum Likelihood, ML) a Bayesiánská inference (Bayes B). Analýza metodou maximální parsimonie byla provedena v programu PAUP* 4.10b (Swofford, 2001) metodou Heuristického vyhledávání. Statistická podpora jednotlivých větvení byla ověřena bootstrapovou analýzou (1000 replikací). Datasey pro ML analýzu byly nejdříve podrobeny zpracování v programu ModelTest 3.7 (Posada a Crandall, 1998) s cílem určení partikulárního modelu pro evoluci sekvencí, který nejlépe odpovídá analyzovaným datům (model GTR+ Γ +I). ML stromy pak byly počítány programem PHYML 2.4.2 (Guindon a Gascuel, 2003), s neparametrickou bootstrapovou analýzou pro 100 replikací. Bayesiánská analýza byla provedena programem Mr. Bayes 3.0b4 (Huelsenbeck a Ronquist, 2001), s modelem GTR+ Γ +I. Posterior probability byly odhadnuty pro 2 000 000 generací.

D. Výsledky

1. Amplifikace genů

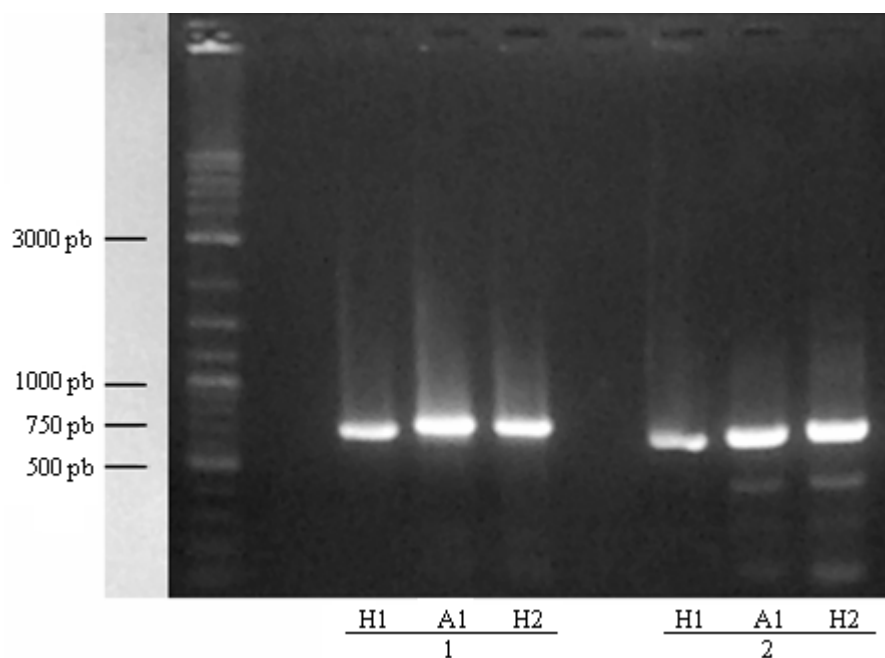
Pro amplifikaci 18S rDNA byly použity primery NS1/NS2 (Wu a kol., 2001), které amplifikovaly úsek cca 520 pb (Obr. 5), celé sekvence genu bylo dosaženo navržením vlastních primerů SSUF/SSUR a SSU1F/SSU1R (tab. 2), které amplifikovaly dvě části, každá o velikosti 730 pb (obr. 6). Velikost celého genu je 1741 pb.

Plastidová 16S rDNA byla amplifikována použitím primerů CS1/CS2 (Wu a kol., 2001). Tyto primery amplifikovaly část o velikosti cca 520 pb. Protože však primárním cílem této práce bylo navrzení kmenově specifických primerů, podle nichž bude možno spolehlivě diagnostikovat ten či onen kmen, bylo třeba najít dostatečně variabilní sekvenci. Zkoumaný úsek 16S rDNA byl však překvapivě velmi konzervativní a pro tento účel zcela nevhodný, proto bylo od amplifikace zbývajících částí genu upuštěno. Fylogenetická analýza byla provedena na základě úplné sekvence 18S rDNA a právě části 16S rDNA.



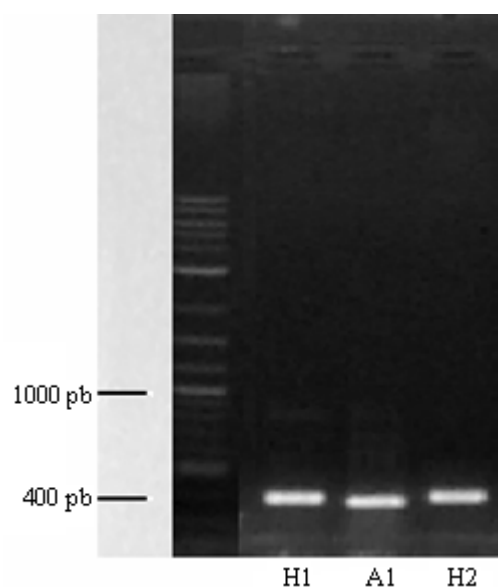
Obr. 5. Gel zachycující segment 18S rDNA a 16S rDNA o velikosti cca 520 pb.

- 1) část 18S rDNA zleva do prava postupně pro kmeny H1, A1, H2
- 2) úsek 16S rDNA pro kmeny H1, A1, H2



Obr. 6. Zbývající části 18S rDNA. **1)** fragment 420 – 1150 pb, **2)** fragment 1050 –1800 pb. Kmeny H1, A1, H2 jsou opět znázorněny postupně zleva do prava

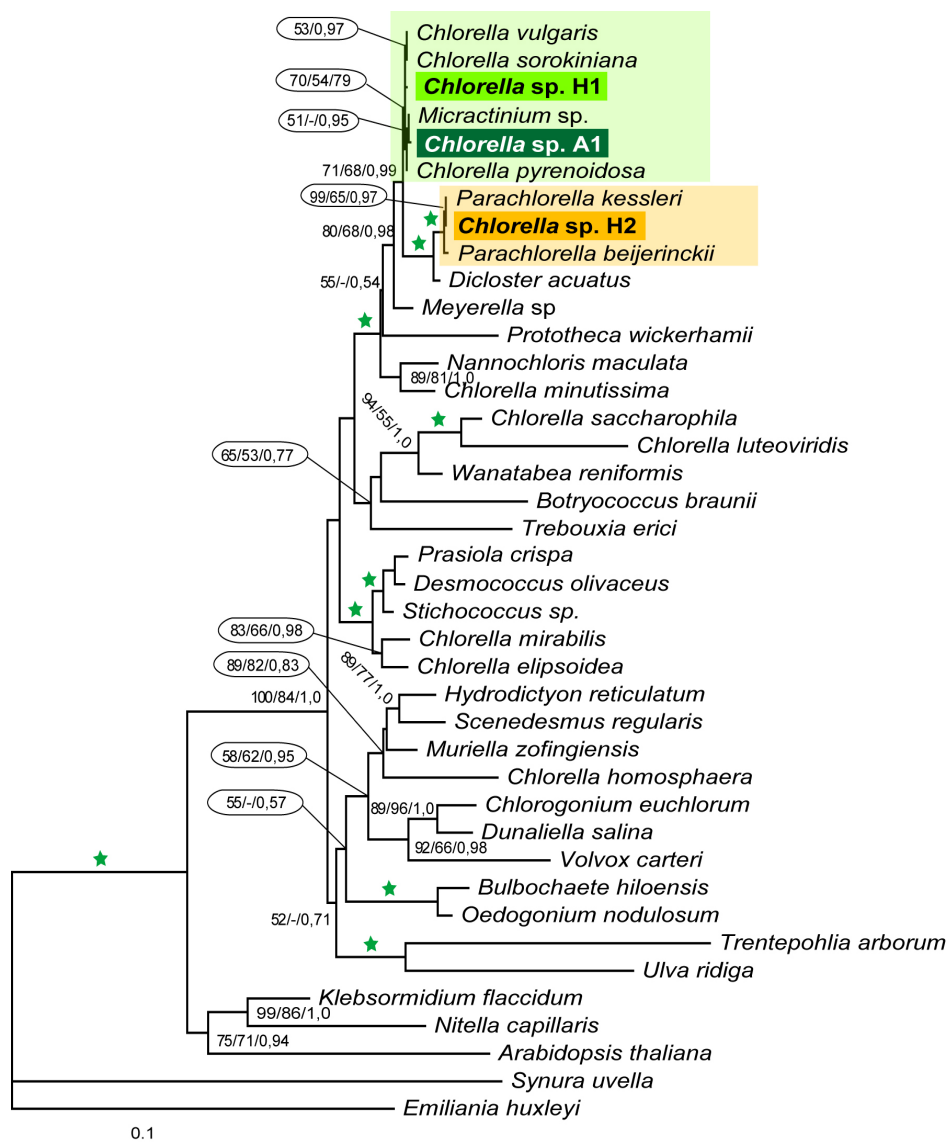
Sekvence ITS1 byly získány použitím primerů ITS1F/ITS1R (tab.2), primárně za účelem navržení specifických primerů. Protože jsou tyto sekvence také velmi vhodné pro odhalování příbuzenských vztahů na těch nejnižších taxonomických úrovních, byla provedena fylogenetická analýza i zde, zejména pro druhy rodu *Chlorella* (obr. 9). Primery amplifikovaly sekvenci dlouhou cca 400 bazí (obr. 7), kromě spaceru také část 18S a 5,8S rDNA, avšak tyto části byly z alignmentu odstraněny a pro analýzu použit pouze ITS1.



Obr. 7. Gel ukazující amplifikovaný ITS1 pro kmeny (H1, A1, H2)

2. Sekvenční analýza

Podářilo se mi osekvenovat jednu řástteřnou a dře kompletní sekvence genů vybraných pro charakterizaci a identifikaci tře produkčních kmenů řasy *Chlorella* sp. Jak ukazují prezentované fylogramy (obrázky 4, 5, 6), variabilita genů pro plastidovou a jadernou SSU rRNA je velmi nízká (extrémně krátké větve) a tyto geny nemohou být použity bez dalších molekulárních znaků k charakterizaci kmene. Proto jsem pro tento účel



Obr. 4. Fylogenetický strom konstruovaný na základě genu pro 18S rRNA metodou ML. Hodnoty u jednotlivých větvení udávají bootstrapy pro ML a MP (ML = 100 replikací, MP = 1000 replikací) a Mr. Bayes posterior probability pro 2 000 000 generací. V místech hvězdiček byly hodnoty bootstrapů vyšší než 90% a posterior probability rovna 1.0

využil sekvence genu pro ITS1, které byly odlišné natolik, že mohly být použity pro konstrukci kmenově specifických primerů pro PCR diagnostiku cílových kmenů. Schématické znázornění jednotlivých amplikonů a velikosti asemblovaných genů jsou uvedeny v příloze (tabulka 4).

3. Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza byla provedena s cílem určit fylogenetickou a taxonomickou pozici tří kmenů používaných v řasových biotechnologiích. Dva z těchto kmenů jsou heterotrofní (naše označení H1 a H2) a jeden autotrofní (A1). Analýza malé ribosomální podjednotky (obrázek 4) ukázala, že heterotrofní kmen H2 patří jednoznačně do rodu *Parachlorella*, pravděpodobně pak do druhu *Parachlorella kessleri*. Ukázalo se, že gen pro 18S rRNA nenese dostatek informace pro jednoznačné rozlišení kmenů H1 a A1. Zároveň tento molekulární marker není vhodný pro klasifikaci druhů, jako jsou *C. vulgaris*, *C. sorokiniana* a *C. pyrenoidosa* v rámci rodu *Chlorella*, protože tyto druhy mají sekvenci 18S rRNA extrémně podobnou, lišící se pouze ve třech až čtyřech nukleotidech.

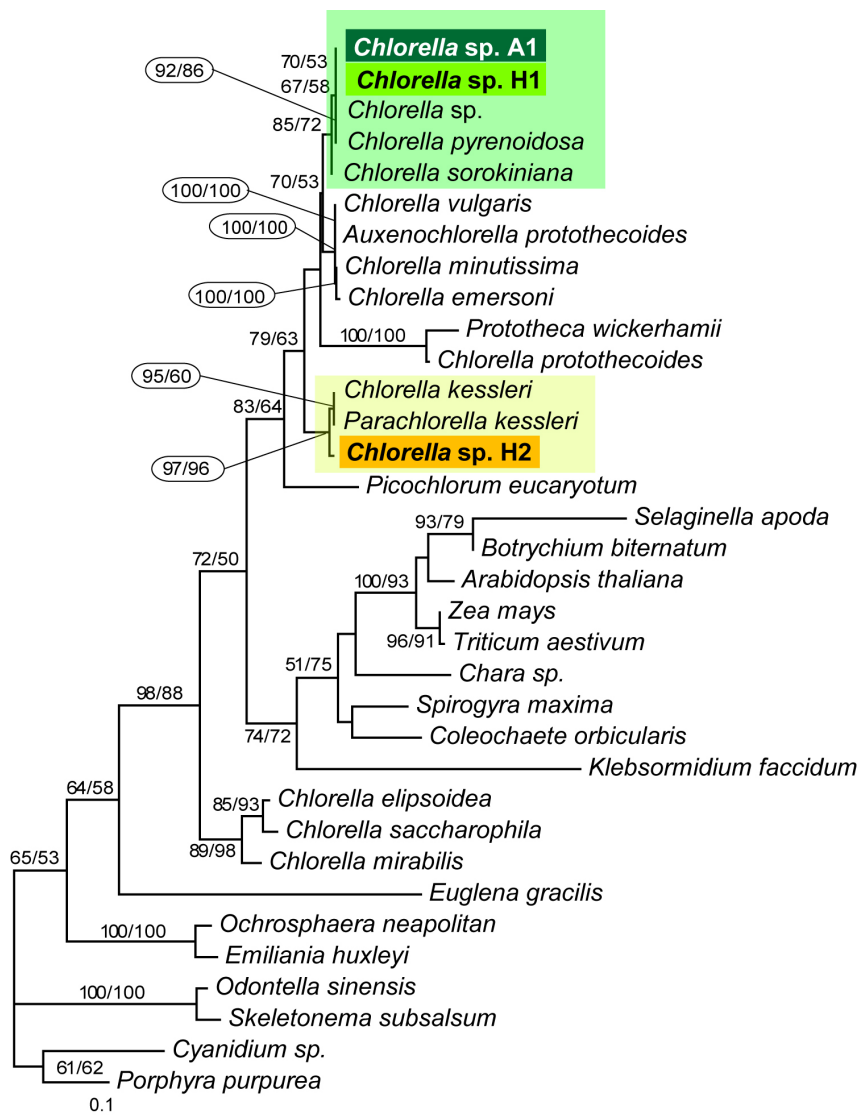
Druhý použitý marker, plastidová 16S rRNA, není výrazně více informativní než její jaderný homolog. Co se týče produkčních kmenů A1 a H1, jejich sekvence jsou v tomto případě opět téměř identické (obrázek 5).

Výrazný pokrok z pohledu molekulární identifikace produkčních kmenů rodu *Chlorella* přinesl teprve třetí sekvenovaný marker a sice mezerník ITS1 (obrázek 6). ITS1 je nejen dostatečně variabilní k rozlišení jednotlivých produkčních kmenů, zejména A1 a H1, ale variabilita tohoto markeru dokonce umožňuje sestavení kmenově specifických primerů pro PCR diagnostiku testovaných produkčních kmenů. Kmen H2 se opět klastruje s *P. kessleri*, kmen H1 pak dle ITS1 náleží k druhu *C. sorokiniana*; druhová příslušnost kmene A1 zůstává nejasná. V ITS1 stromu A1 tvoří sesterskou skupinu k *Auxenochlorella protothecoides*, ale tento vztah není statisticky podpořen (obrázek 6).

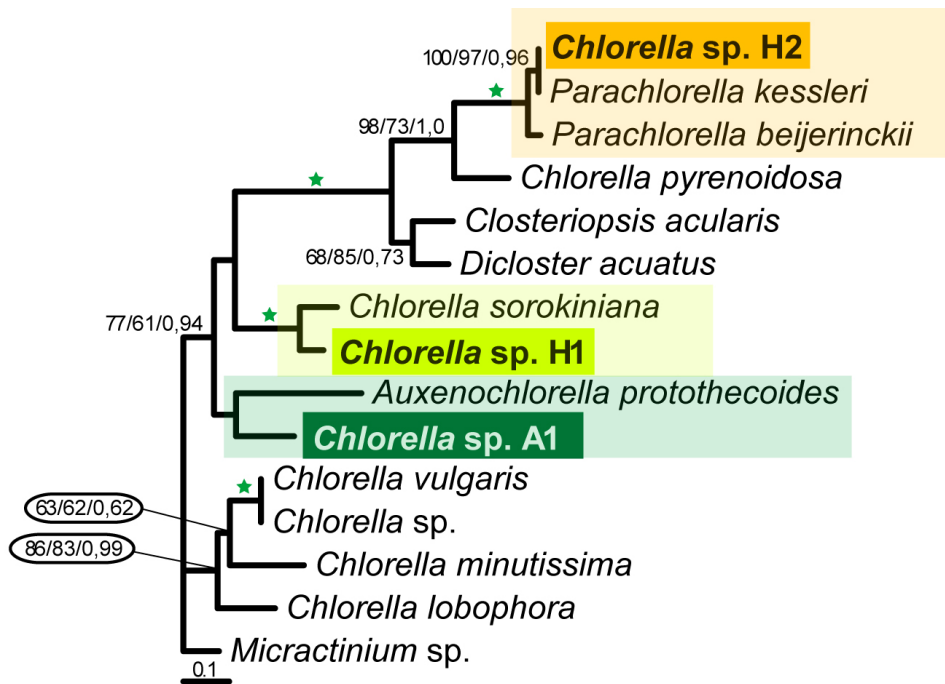
4. Kmenově-specifické primery

Kmenově specifické primery byly navrženy ze sekvence ITS1 (obr. 3a, 3b). Výsledek amplifikace je ukázán na obr. 4. DNA z každého kmene byla amplifikována i s primery specifickými pro zbylé dva kmene, tzn. specifické primery pro kmen H1 (Het1/Het2) byly zkoušeny u kmenů A1 a H2, primery pro kmen A1 (Aut1/Aut2) u kmenů H1 a H2 a primery pro kmen H2 (Chlo1/Chlo2) byly testovány u kmenů H1 a A1. Zbývající

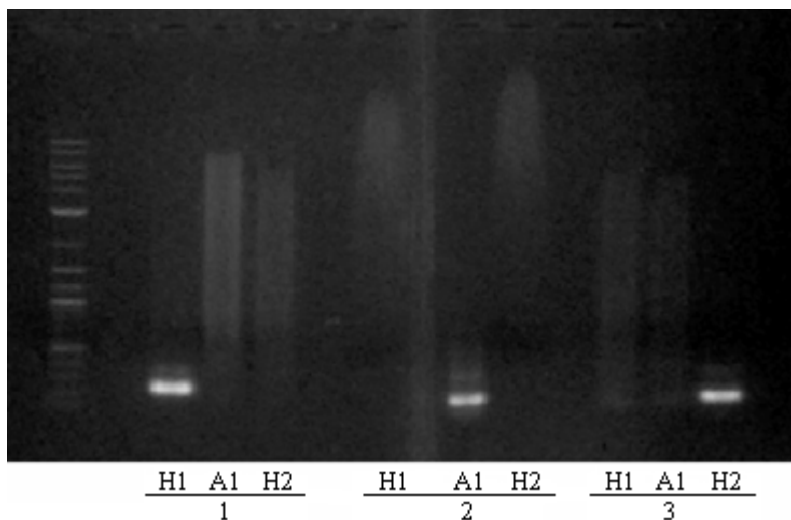
dva kmeny sloužily tedy jako kontrola specifity navrženého primeru pro daný kmen. Sekvence specif. primerů jsou uvedeny v tabulce 2. Specifické primery jsou dostatečně diskriminativní pro rozlišení všech kmenů včetně hodně podobných A1 a H1. Nebyly však dosud testovány na širším spektru kmenů, protože tyto kmeny nejsou k dispozici. Tato finalizace pak bude provedena mimo rámec předkládané diplomové práce.



Obr. 5 Fylogenetický strom konstruovaný na základě dat genu pro 16S rRNA použitím metody ML. Hodnoty na spojnicích větví udávají bootstrapy pro ML a MP (ML = 100 replikací, MP = 1000 replikací).



Obr. 6. Fylogenetický strom konstruovaný na základě dat získaných ze sekvenace ITS1 použitím metody ML. Hodnoty na spojnicích větví udávají bootstrapy pro ML a MP (ML = 100 replikací, MP = 1000 replikací) a Mr. Bayes posterior probability pro 2000 000 generací. V místech hvězdiček byly hodnoty bootstrapů vyšší než 90% a posterior probability rovna 1.0



Obr. 4. Gel ukazující specificky navržené primery pro jednotlivé kmeny chlorel.
 1. DNA kmenů (H1, A1, H2) amplifikována s primery Het1/Het2 specifickými pro heterotrofní kmen H1,
 2. DNA kmenů (H1, A1, H2) amplifikována s primery Aut1/Aut2 specifickými pro autotrofní kmen A1,
 3. DNA kmenů (H1, A1, H2) amplifikována s primery Chlo1/Chlo2 specifickými pro heterotrofní kmen H2

E. Diskuze

1. Fylogenetická analýza

Taxonomie rodu *Chlorella* byla dlouho problematická a fylogenetická pozice různých druhů v rámci Chlorophyta neznámá. V současné době umožňují molekulární data i kombinace fyziologických, biochemických a ultrastrukturálních znaků identifikovat jednotlivé druhy a umístit je do systému. Nicméně znaky, které jsou fylogeneticky významné u r. *Chlorella*, nemusejí být nutně tak přínosné u jiných skupin řas a musí být stanoveny nezávisle pro každou skupinu řas (Huss a kol., 1999). Často dochází ke konfrontaci, kdy se molekulární a “klasická“ systematika neshodují pro danou skupinu organismů. Identifikace fylogeneticky významných znaků a jejich aplikace v systematice těchto kritických skupin by v mnoha případech mohla umožnit zařazení do systému bez nutnosti určování molekulárních sekvencí. Kromě jejich hodnot pro systematiku, má zpravidla znalost biochemických a fyziologických vlastností praktický význam v základním výzkumu a biotechnologiích (Kessler, 1986, 1992). Pro rod *Chlorella* to zjevně není možné. Stopování evoluční historie skupiny organismů s tak málo variabilními morfologickými a ultrastrukturálními znaky, jak je tomu u zástupců rodu *Chlorella*, není proveditelné pouze na základě morfologických znaků.

V této práci byla fylogenetická analýza provedena na základě sekvencí 18S rDNA, části plastidové 16S rDNA a sekvence ITS1. Zjistil jsem, že obě malé podjednotky, ať už jaderná nebo plastidová, nenesou dostatek informace potřebné k rozlišení druhů *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* a *C. pyrenoidosa* v rámci rodu *Chlorella*. Jiná možná interpretace pak říká, že tyto chlorelly mohou reprezentovat jeden druh. Moje analýza též jasně potvrzuje polyfýlii a tak i taxonomickou neplatnost tohoto rodu. Sekvence mezigenového mezerníku (ITS1) nesou dostatek informace jak pro rozlišení jednotlivých kmenů, tak pro sestavení primerů pro PCR diagnostiku (viz. níže). Je třeba ale poznamenat, že topologie získaná analýzou ITS1 příliš neodpovídá topologii dalších dvou analyzovaných genů.

Moje výsledky jasně ukazují na nutnost taxonomické revize řas řazených do rodu *Chlorella*. Je také zřejmé, že morfologické znaky, které slouží ke klasické klasifikaci řas polyfyletického rodu *Chlorella*, jsou výrazně ovlivněny konvergencí.

2. Hledání specifických primerů: PCR diagnostika

Hlavním cílem této práce bylo nalezení kmenově specifických primerů pro 3 kmeny chlorel, podle nichž bude možné jednoznačně a spolehlivě diagnostikovat daný kmen. Protože všechny druhy rodu *Chlorella* jsou organismy jednobuněčné s kokální stélkou a na základě morfologie jsou rozpoznatelné pouze některé druhy a to ještě velmi obtížně, byla nutná charakterizace na molekulární úrovni. Pro vytvoření takového markeru bylo nezbytné najít natolik variabilní sekvenci, která se bude dostatečně lišit i na mezidruhové úrovni a mohla tak být k tomuto účelu použita. Z dříve publikovaných studií, které se zabývaly příbuzenskými vztahy zelených řas (Huss a kol. 1999), a obzvláště v rodu *Chlorella* (Wu a kol., 2001), byla vybrána jaderná 18S rDNA a plastidová 16S rDNA. Z práce (Wu a kol., 2001) byly převzaty primery pro 16S rDNA, které amplifikovaly 520 bp začátku genu. Po osekvenování této oblasti bylo zřejmé, že tento gen pro náš účel vhodný nebude. Z celého úseku se sekvence lišily pouze ve dvou nukleotidech. Ze sekvencí různých druhů chlorel, u nichž byla malá plastidová podjednotka sekvenována celá (data převzaté z NCBI), byl vytvořen alignment za účelem zjištění, zda se nějaká variabilnější oblast nenachází v jiné části genu. 16S rDNA je užitečná pro charakteristiku příbuzenských vztahů od rodů výše, pro odhalování vztahů na mezidruhové úrovni však příliš vhodný není.

Další variantou zkoumanou v této práci byl gen pro malou jadernou podjednotku (18S rDNA). Tento gen byl zároveň použit pro fylogenetickou analýzu. 18S rDNA byla amplifikována celá (1741 bp). Pro účel navržení kmenově specifických primerů nebyl ani tento gen vhodný. Sekvence v nejvariabilnějších oblastech, které by bylo možné zahrnout do jednoho primeru, se lišila nanejvýš ve dvou nukleotidech, a to by bylo k vytvoření specifického markeru zřejmě málo. Úspěch slavily až sekvence získané z ITS1 (internal transcribed spacer). Oblast ITS1 se nachází mezi 18S rDNA a 5,8S rDNA (obr. 1) a její délka u r. *Chlorella* je 241 bp. Dostatečná variabilita v mnoha pozicích u různých druhů a kmenů chlorel umožnila vytvoření primerů, které jednoznačně vymezují příslušný kmen.

F. Závěr

V této práci byly studovány 3 kmeny *Chlorella* spp., které dodala Laboratoř řasových biotechnologií Mikrobiologického ústavu AV ČR (Třeboň, Česká republika), heterotrofní kmeny H1 a H2 a autotrofní kmen A1. Větší pozornost byla věnována kmenům H1 a A1, které v Třeboni produkují pro výrobu potravinových doplňků pro lidi (A1) a jako přídavek do krmných směsí pro zvířata (H1).

Fylogenetická analýza byla provedena na základě genů pro malou jadernou a plastidovou podjednotku a přepisovaného jaderného mezerníku ITS1. Z fylogenetických stromů je patrné, že se v sekvencích 18S rDNA a 16S rDNA druhy příliš neliší, v určitých případech by dokonce mohlo jít o tentýž druh. Z našich kmenů se výrazněji odlišuje kmen H2, který ve všech stromech vyšel nejbližší k druhu *Parachlorella kessleri* a pravděpodobně se jedná o tento druh. Kmeny H1 a A1 jsou si velmi podobné a rozdíly byly zaznamenány až na základě analýzy velmi variabilního ITS1. Výsledky ukazují, že kmen H1 je s největší pravděpodobností *Chlorella sorokiniana* a A1 tvoří sesterskou skupinu s druhem *Auxenochlorella protothecoides*.

Žádný z těchto tří kmenů nebyl doposud charakterizován molekulárními metodami. Specifické markery pro všechny 3 kmeny byly odvozeny ze sekvence ITS1. Molekulární charakterizace byla nezbytná nejen proto, že jednotlivé kmeny chlorel jsou k nerozeznání podobné, ale také proto, že Laboratoř řasových biotechnologií má v úmyslu si nechat kmen H1 patentovat, což by bez možnosti identifikace na molekulární úrovni nebylo možné.

G. Použitá literatura

- ALBERTS, B., JONSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P.** (2002). *Molecular biology of the cell*, Fourth ed., New York: Garland Science, 1616 pp.
- BALDWIN, B. G.** (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositaogy. *Mol. Phyl. Evol.* 1, 3–16
- BASSHAM, J. A., CALVIN, M.** (1957). *The Path of Carbon in Photosynthesis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 104 pp.
- BENDICH, A. J.** (2004). Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell*. 16, 1661-1666
- BOOTON, G. C., FLOYD, G. L., FUERST, P. A.** (2002). Polyphyly of tetrasporalean green algae inferred from nuclear small-subunit ribosomal DNA. *J. Phycol.* 34, 306–311.
- BUCHHEIM, M. A., MICHALOPULOS, E. A., BUCHHEIM, J. A.** (2001). Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: a study of 18S and 26S rDNA data. *J. Phycol.* 37, 819–835.
- BUCHHEIM, M. A., TURMEL, M., ZIMMER, E. A., CHAPMAN, R. L.** (1990). Phylogenetic systematics of *Chlamydomonas* based on cladistic analysis of nuclear 18S rRNA sequence data. *J. Phycol.* 26, 689–699.
- CALVIN, M. , BENSON, A. A., BASSHAM, J. A., GOODALE, T. C., HAAS, V. A. STEPKA, W.** (1950) The path of carbon in photosynthesis. V. Paper chromatography and radioautography of the products. *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 1710–18.
- DASILVA, E. J., GYLLENBERG, H. G.** (1972). A taxonomic treatment of the genus *Chlorella* by the technique of continuous classification. *Arch. Mikrobiol.* 87, 99–117.
- DE KONING, A. P., KEELING, P. J.** (2006). The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured. *BMC Biol.* 4, 12.
- DE-BASHA, L. E., TREJO, A., HUSS, V. A. R., HERNANDEZ, J. P., BASHAN, Y.** (2007) *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technol.* 99, 4980–4989.
- DOUGLAS, L. J., HAYMER, D. S.** (2001). Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94, 726-731.
- DOUCHA J., LÍVANSKÝ K.** (1995). Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: Productivity and operational parameters. *Algol. Stud.* 76, 129-147.

- ELSTER, J., LUKEŠOVÁ, A., ADAMEC, L., FRIEDL, T.** (2004). Biology (ecology, physiology and molecular genetics) of polar polyphyletic *Chlorella* strains. Preliminary results. COBRA, Partner Review Meeting, Třeboň.
- ETTL, H.**(1980): Grundriss der allgemeinen Algologie, 549 pp., ed. G. Fischer, Jena.
- FALKOWSKI, P. G., RAVEN, J. A.** (1997). Aquatic Photosynthesis. Oxford: Blackwell Science, 375 pp.
- FAWLEY, M. W., LEE, C. M.** (1990). Pigment composition of the scaly green flagellate *Mesostigma viride* (Micromonadophyceae) is similar to that of the siphonous green alga *Bryopsis plumosa* (Ulvophyceae). *J. Phycol.* 26, 666-670.
- FOTT, B., NOVÁKOVÁ, M.** (1969). A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species. In: Fott, B. [Ed.], Studies in Phycology. Academia, Prague, pp. 10–74.
- FOTT, B.** (1971). Algenkunde. 581 pp. Jena.
- FOTT, B., LOCHHEAD, R., CLÉMENÇON, H.** (1975). Taxonomie der Arten *Chlorella ultrasquamata* CLÉM. et FOTT und *Chlorella fusca* SHIH. et KRAUSS. *Arch. Protistenkd.* 117, 288–96.
- FRIEDL, T.** (1995). Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae—a phylogenetic analysis of 18S ribosomal-RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae Cl. Nov). *J. Phycol.* 31, 632–639.
- FRIEDL, T., O'KELLY, C. J.** (2002). Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure. *Eur. J. Phycol.* 37, 373–384.
- FRIEDL, T., ZELTNER, C.** (1994). Assessing the relationships of some coccoid green lichen algae and the Microthamniales (Chlorophyta) with 18S ribosomal-RNA gene sequence comparisons. *J. Phycol.* 30, 500–506.
- GOFF, L., LIDDLE, L. B., SILVA, P. C., VOYTEK, M., COLEMAN, A. W.** (1992). Tracing species invasion in *Codium*, a siphonous green alga, using molecular tools. *Am. J. Bot.* 79, 1279–1285.
- GUINDON, S., GASCUEL, O.** (2003). PHYML—a simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696-704.
- HALL, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acid. Res.* 41, 95-98.

- HANAGATA, N., KARUBE, I., CHIHARA, M., SILVA, P. C.** (1998). Reconsideration of the taxonomy of ellipsoidal species of *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with establishment of *Watanaea* gen. nov. *Phycol. Res.* 46, 221-229 .
- HAYDEN, H. S., WAALAND, J. R.** (2002). Phylogenetic systematics of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear DNA sequences. *J. Phycol.* 38, 1200–1212.
- HEGEWALD, E., SCHNEPF, E.** (1991). *Scenedesmus abundans* (Kirchn.) Chod., an older name for *Chlorella fusca* Shih. et Kraus. *Arch. Protistenkd.* 139, 133–76.
- HELLMANN, V., KESSLER, E.** (1974b). Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattungen *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus* III. Die Basenzusammensetzung der DNS. *Arch. Microbiol.* 100, 239-42.
- HEMMRICH, G., ANOKHIN, B., ZACHARIAS, H., BOSCH, T. C. G.** (2007). Molecular phylogenetics in *Hydra*, a classical model in evolutionary developmental biology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 281-290
- HILLIS, D. M., DIXON, M. T.** (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66, 411-453.
- HOOPS, H. J.** (1997). Motility in the colonial and multicellular Volvocales: structure, function and evolution. *Protoplasma* 199, 99–112.
- HOWE G. T., CHRISTOPHER J., BARBROOK C. A, KOUMANDOU V. L., NISBET R. E. R., SYMINGTON H. A., WIGHTMAN T. F.** (2003). Evolution of the chloroplast genome. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 358, 99-106.
- HUELSENBECK, J. P., RONGUIST, F., NIELSEN, R., BOLLBACK, J. P.** (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science.* 294(5550), 2310-2314.
- HUSS, V. A .R, CINIGLIA, C., CENNAMO, P., COZZOLINO, S., PINTO, G. POLLIO, A.** (2002). Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella*-like isolates from low pH environments (pH < 3.0). *BMC Evol. Biol.*, 2, 13.
- HUSS, V. A. R, FRANK, C., HARTMANN, C. E., HIRMER, M., KLOBOUCEK, A., SEIDEL, B. M., WENZELER, P., KESSLER, E.** (1999). Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *J. Phycol.* 35, 587–598.
- HUSS, V. A. R., SOGIN, M. L.** (1990). Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the Chlorococcales based upon complete small subunit ribosomal RNA sequences. *J. Mol. Evol.* 31, 432–442.

- HUSS, V. A. R., HUSS, G., KESSLER, E.** (1989a). Deoxyribonucleic acid reassociation and interspecies relationships of the genus *Chlorella* (Chlorophyceae). *Plant Syst. Evol.* 168, 71–82.
- HUSS, V. A. R., SCHARPF, T. K., KESSLER, E.** (1989b). Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella*. V. *Chlorella vulgaris*, *C. luteoviridis*, *C. minutissima*, and *C. zofingiensis*. *Arch. Microbiol.* 152, 512–4.
- HUSS, V. A. R., WEIN, K. H., KESSLER, E.** (1988). Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella*. IV. *Chlorella protothecoides* and its relationship to the genus *Prototheca*. *Arch. Microbiol.* 150, 509–11.
- IKEDA, T., TAKEDA, H.** (1995). Species-specific differences of pyrenoids in *Chlorella* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 31, 813–8.
- KALINA, T.** (1994): Systém a vývoj sinic a řas. 165 p., skripta UK Praha.
- KANTZ, T. S., THERIOT, E. C., ZIMMER, E. A., CHAPMAN R. L.** (1990). The Pleurastrophyceae and Micromonadophyceae: a cladistic analysis of nuclear rRNA sequence data. *J. Phycol.* 26, 711–721.
- KAPRAUN, D. F.** (2007). Nuclear DNA Content Estimates in Green Algal Lineages: Chlorophyta and Streptophyta. *Ann. Bot.-London.* 99(4), 677-701.
- KAROL, K. G., MCCOURT, R. M., CIMINO, M. T., DELWICHE, C. F.** (2001). The closest living relatives of land plants. *Science* 294, 2351–2353.
- KERFIN, W., KESSLER, E.** (1978). Physiological and biochemical contributions tigation of some *Nannochloris* species (Chlorococcales) with particular reference to the systematic position of *Nanochlorum eucaryotum*. *Bot. Acta.* 102, 152–8.
- KESSLER, E., SCHAFFER, M., HUMMER, C., KLOBOUCEK, A., HUSS, V. A. R.** (1997). Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Bot. Acta.* 110, 244-250.
- KESSLER, E., HUSS, V. A. R.** (1992). Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the Culture Collection of the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 28, 550–3.
- KESSLER, E., SOEDER, C. J.** (1962). Biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. *Nature* 194, 1096–7.
- KESSLER, E.** (1953). Über den Mechanismus der Nitratreduktion von Grünalgen. II. Vergleichend-physiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* 19, 438–57.
- KESSLER, E.** (1982). Chemotaxonomy in the Chlorococcales. In Round, F. E., Chapman, D. J. [Eds.], *Prog. Phycol. Res.* 1, 111–35.

- KESSLER, E.** (1986). Limits of growth of five *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals. *Algol. Stud.* 42, 123–8.
- KESSLER, E.** (1992). *Chlorella*-biochemische Taxonomie einer für Forschung und Biotechnologie wichtigen Gattung einzelliger Grünalgen. *Naturwissenschaften.* 79, 260–5.
- KIRK, D. L.** (2003). Seeking the ultimate and proximate causes of *Volvox* multicellularity and cellular differentiation. *Integr. Comp. Biol.* 43, 247–253.
- KOMÁREK, J., JANKOVSKÁ, V.** (2001). Review of the green algal genus *Pediastrum*: Implications for pollen analytical research. *Bibl. Phycol.* 108, 127 pp.
- KONISHI, F., TANAKA, K., HIMENO, K., TANIGUCHI, K., NOMOTO, K.** (1985). Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 19, 73–8.
- KOUWETS, F. A. C.** (1995). Comparative ultrastructure of sporulation in six species of *Neochloris* (Chlorophyta). *Phycologia.* 34, 486–500.
- KRIENITZ, L., HEGEWALD, E. H., HEPERLE, D., HUSS, V. A. R., ROHRS, T., WOLF, M.** (2004). Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia.* 43, 529-542
- KRIENITZ, L., HEGEWALD, E., HEPERLE, D., WOLF, M.** (2003). The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology. *Biologia.* 58, 437–446.
- KÜMMEL, H., KESSLER, E.** (1980). Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. XIII. Serological studies. *Arch. Microbiol.* 126, 15–9.
- LAM, Y. W., TRINKLE-MULCAHY, L., LAMOND, A. I.** (2005) The nucleolus. *J. Cell Sci.* 118, 1335-1337.
- LEE, E. R.** (2008). *Phycology*. Fourth edition: Cambridge University Press, pp. 139-191
- LEMIEUX, C., OTIS, C., TURMEL, M.** (2007). A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biol.* 5, 2.
- LEWIS, L. A., MCCOURT, R. M.** (2004). Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91(10), 1535–1556.
- LEWIS, L. A., WILCOX, L. W., FUERST, P. A., FLOYD, G. L.** (1992). Concordance of molecular and ultrastructural data in the study of zoosporic chlorococcalean green algae. *J. Phycol.* 28, 375–380.

- LÍVANSKÝ, K., DOUCHA, J., HU, H., LI, Y.** (2006): CO₂ partial pressure-pH relationships in the medium and relevance to CO₂ mass balance in outdoor open thin-layer *Arthrospira* (*Spirulina*) cultures. *Arch. Hydrobiol.* 165, 365-381.
- LUO, W., PFLUGMACHER, S., PROSCHOLD, T., WALZ, N., KRIENITZ, L.** (2006). Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist.* 157: 315-333
- MANDOLI, D.** (1998). Elaboration of body plan and phase change during development of *Acetabularia*: how is the complex architecture of a giant unicell built. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 173–198.
- MATTOX, K. R., STEWART, K. D.** (1984). Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. In: Systematics of the Green Algae. Irvine, D. E. G., John, D. M. [Eds.], Academic Press, London, UK, pp. 29-72.
- MEI, H., LUO, W., LIU, G. X., HU, Y. Z.** (2007). Phylogeny of Oedogoniales (Chlorophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rDNA sequences with emphasis on the relationships in the genus *Oedogonium* based on ITS-2 sequences. *Plant Syst. Evol.* 265, 179-191.
- MEINESZ, A.** (1999). Killer algae: the true tale of a biological invasion. The University of Chicago Press, 360 pp., Chicago, Illinois, USA.
- MELKONIAN, M.** (1990a). Chlorophyte orders of uncertain affinities: order Microthamniales. In: Handbook of Protoctista. Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D. J. [Eds.], Jones and Bartlett, Boston, Massachusetts, USA, pp. 652–654
- MISHLER, B. D., LEWIS, L. A., BUCHHEIM, M. A., RENZAGLIA, K. S., GARBARY, D. J., DELWICHE, C. F., ZECHMAN, F. W., KANTZ, T. S., CHAPMAN, T. S.** (1994). Phylogenetic relationships of the “green algae” and “bryophytes.” *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81, 451–483.
- MITCHELL, D. R.** (2000). *Chlamydomonas* flagella. *J. Phycol.* 36, 261–273.
- MIYAZAWA, Y., MURAYAMA, T., OOYA, N., WANG, L. F., TUNG, Y. C., YAMAGUCHI, N.** (1988). Immunomodulation by a unicellular green algae (*Chlorella pyrenoidosa*) in tumor-bearing mice. *J. Ethnopharmacol.* 24,135–46.
- MOORE, R. B., OBORNÍK, M., JANOUŠKOVEC, J., CHRUDIMSKÝ, T., VANCOVÁ, M., GREEN, D. H., WRIGHT, S. W., DAVIES, N. W., BOLCH, C. J. S., HEIMANN, K., ŠLAPETA, J., HOEGH-GULDBERG, O., LOGSDON, J. M., CARTER, D. A.** (2008). A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 451, 959-963.

- MURRAY, N. W.** (2004). *Introduction to Botany*. Pearson Education, Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- NAKAHARA, M., HANDA, S., NAKANO, T.** (2003). Culture and pyrenoid structure of a symbiotic *Chlorella* species isolated from *Paramecium bursaria*. *Symbiosis* 34, 203-214.
- NIELSEN, H., SORENSEN, I.** (1992). Taxonomy and stratigraphy of lateglacial *Pediastrum* taxa from Lyngby, Denmark—a preliminary study. *Rev. Paleobot. Palyn.* 74, 55–75.
- NIYOI, K. K.** (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 333–359.
- NOZAKI, H.** (1996). Morphology and evolution of sexual reproduction in the Volvocaceae (Chlorophyta). *J. Plant Res.* 109, 353-361.
- OBORNÍK M., JANOUŠKOVEC J., CHRUDIMSKÝ T., LUKEŠ J.** (2009) Evolution of the apicoplast and its host: From heterotrophy to autotrophy and back again. *Int. J. Parasitol.* 39, 1-12.
- OBORNÍK, M., JIRKŮ, M., ŠLAPETA, J. R., MODRÝ, D., KOUDELA, B., LUKEŠ, J.** (2002). Notes on coccidian phylogeny, based on the apicoplast small subunit ribosomal DNA. *Parasitol. Res.*, 88, 360–363.
- PALMER, J. D.** (2003) The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit? *J. Phycol.* 39, 4–11.
- PALMER, J. D.** (1985). Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In R. J. MacIntyre [ed.], *Mol. Evol. Genet.* 131–240.
- PORE, R. S., BARNETT, E. A., BARNES, W. C., WALKER, J. D.** (1983): Prototheca ecology. *Mycopathologia.* 81, 49-62.
- POSADA, D., CRANDALL, K. A.** (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 14, 817-818.
- RAPPAPORT, F., FINAZZI, G., PIERRE, Y., BENNOUN, P.** (1999). A New Electrochemical Gradient Generator in Thylakoid Membranes of Green Algae. *Biochemistry.* 38 (7), 2040–2047
- RAŠKA I. , SHAW P. J., CMARKO, D.** (2006). Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 325-334
- RODRIGUEZ-EZPELETA, N., BRINKMANN, H., BUREY, S. C., ROURE, B., BURGER, G., LÖFFELHARDT, W., BOHNERT, H. J., PHILIPPE, H., LANG, B. F.** (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, & glaucophytes. *Curr. Biol.* 15, 1325–1330.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T.**, (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second ed., Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANDERS, B. G., KELLER, E. C. Jr., WILEY, K. L.** (1971). Identification of *Chlorella* strains by serological techniques. *J. Phycol.* 7, 63–4.
- SANDERSON, M. J.** (2003). Molecular data from 27 proteins do not support a Precambrian origin of land plants. *Am. J. Bot.* 90, 954–956.
- SHIHIRA, J. & KRAUSS, R. W.** (1965). *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. University of Maryland, College Park, pp. 1–92.
- SCHLEIFER, K. H., STACKEBRANDT, E.** (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 143–87.
- SMITH, G. M.** (1950). *The freshwater algae of the United States*. Second ed. McGraw-Hill, New York. 719 pp.
- SOLL, J., SCHLEIFF, E.** (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat. Rev.* 5, 198–208
- STEWART, K. D., MATTOX, K. R.** (1975). Comparative cytology, evolution and classification of the green algae with some consideration of the origin of other organisms with chlorophylls a and b. *Bot. Rev.* 41, 105-131.
- SWOFFORD, D. L.** (2001). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), version 4.10. Sinauer Associates, Sunderland.
- SYM, S. R., PIENAAR, R. M.** (1993). Prasinophytes form independent lineages within the Chlorophyta: evidence from ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Phycol.* 30, 340.
- TAKEDA, H.** (1991). Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 27, 224–32.
- TAKEDA, H.** (1996). Diversity of cell-wall chemical composition and the taxonomy of algae. In: Chaudhary, B. R., Agrawal, S. B. [Eds.], *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. Academic Press, Amsterdam, pp. 291–300.
- TANAKA, K., KOGA, T., KONISHI, F., NAKAMURA, M., MITSUYAMA, M., HIMENO, K., NOMOTO, K.** (1986). Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. *Infect. Immunol.* 53, 267–71.
- UENO, R., HANAGATA, N., URANO, N.** (2006). Molecular phylogeny and phenotypic variation in the heterotrophic green algal genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 41, 1268-1280.
- URBAN, Z., KALINA, T.** (1980): *Systém a evoluce nižších rostlin*. 415 pp., SPN Praha.
- VERNON, D., GUTELL, R. R., CANNONE, J. J., RUMPF, R. W., BIRKY, C. W.** (2001). Accelerated evolution of functional plastid rRNA and elongation factor genes due to

- reduced protein synthetic load after the loss of photosynthesis in the chlorophyte alga *Polytoma*. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1810–1822.
- WARBURG, O.** (1919). Über die Geschwindigkeit der Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen. *Biochem. Z.* 100:230–70. Warburg, O. & Negelein, E. 1920. Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. *Biochem. Z.* 110, 66–115.
- WATANABE, S., HIMIZU, A., LEWIS, L. A., FLOYD, G. L., FUERST, P. A.** (2000). *Pseudoneochloris marina* (Chlorophyta), a new coccoid ulvophycean alga, and its phylogenetic position inferred from morphological and molecular data. *J. Phycol.* 36, 596–604.
- WATANABE, S., FLOYD, G. L.** (1996). Considerations on the systematics of coccoid green algae and related organisms based on the ultrastructure of swarmers. In: Chaudhary, B. R., Agrawal, S. B. [Eds.], *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. SPB Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp. 1-19.
- WATANABE, S., KURODA, N., MAIWA, F.** (2001). Phylogenetic status of *Helicodictyon planctonicum* and *Desmochloris halophila* gen. et comb. nov. and the definition of the class Ulvophyceae (Chlorophyta). *Phycologia.* 40, 421–434.
- WU, H. L., HSEU, R. S., LIN, L. P.** (2001). Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* 42, 115-121.
- YAMADA, T., SAKAGUCHI, K.** (1982). Comparative studies on *Chlorella* cell walls: induction of protoplast formation. *Arch. Microbiol.* 132, 10–3.
- YOON, H. S., HACKETT, J., CINIGLIA, C., PINTO, G., BHATTACHARYA, D.** (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 809–818.
- ZUCCARELLO, G. C., PRICE, N., VERBRUGGEN, H., LELIAERT, F.** (2009). Analysis of a plastid multigene data set and the phylogenetic position of the marine macroalga *caulerpa filiformis* (chlorophyta). *J. Phycol.* 45, 1206-1212.

H. Přílohy

druh	Accession number 18S rDNA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	X16077
<i>Botryococcus braunii</i>	AJ581912
<i>Bulbochaete hiloensis</i>	U83132
<i>Desmococcus olivaceus</i>	EU434017
<i>Dicloster acuatus</i>	FM205848
<i>Dunaliella salina</i>	EF473749
<i>Emiliana huxleyi</i>	AF184167
<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	M74497
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	X63520
<i>Chlorella homosphaera</i>	X73996
<i>Chlorella luteoviridis</i>	AB006045
<i>Chlorella minutisima</i>	AB006046
<i>Chlorella mirabilis</i>	X74000
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	AB240151
<i>Chlorella saccharophila</i>	X63505
<i>Chlorella sorokiniana</i>	X62441
<i>Chlorella vulgaris</i>	AB080308
<i>Chlorogonium euchlorum</i>	AB278610
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	M95613
<i>Meyerella planktonica</i>	AY543042
<i>Micractinium sp.</i>	FM205877
<i>Muriella zofingiensis</i>	X74004
<i>Nannochloris maculata</i>	AB080302
<i>Nitella capillaris</i>	AJ250111
<i>Oedogonium nodulosum</i>	DQ018735
<i>Parachlorella beijerinckii</i>	FM205845
<i>Parachlorella kessleri</i>	AB080309
<i>Prasiola crispa</i>	EF200532
<i>Prototheca wickerhamii</i>	X56099
<i>Scenedesmus regularis</i>	AB037095
<i>Stichococcus sp.</i>	AB183601
<i>Synura uvella</i>	U73222
<i>Trebouxia erici</i>	AB080310
<i>Trentepohlia arborum</i>	DQ399589
<i>Ulva rigida</i>	AJ005414
<i>Volvox carteri</i>	X53904
<i>Watanabea reniformis</i>	X73991


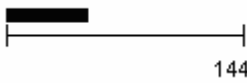
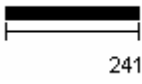
Tabulka 1. Organismy zahrnuté v analýze 18S rDNA a jejich GenBank accession numbers.

druh	Accession number 16S rDNA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AP000423
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	AY553213
<i>Botrychium biternatum</i>	U24581
<i>Coleochate orbicularis</i>	U24579
<i>Cyanidium</i> sp.	FJ390400
<i>Emiliana huxleyi</i>	AY741371
<i>Euglena gracilis</i>	X70810
<i>Chara</i> sp.	X75519
<i>Chlorella ellispoidea</i>	X12742
<i>Chlorella emersoni</i>	AJ242751
<i>Chlorella kessleri</i>	D11346
<i>Chlorella minutissima</i>	EF030601
<i>Chlorella mirabilis</i>	X65100
<i>Chlorella protothecoides</i>	X65688
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	AJ387756
<i>Chlorella saccharophila</i>	D11348
<i>Chlorella sorokiniana</i>	X65689
<i>Chlorella</i> sp.	AJ387757
<i>Chlorella vulgaris</i>	AF350259
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	AF393598
<i>Nitella flexilis</i>	AF278748
<i>Odontella sinensis</i>	AJ536457
<i>Ochrosphaera neapolitan</i>	X80390
<i>Parachlorella kessleri</i>	FJ968741
<i>Picochlorum eucaryotum</i>	X76084
<i>Porphyra purpurea</i>	U38804
<i>Prototheca wickerhamii</i>	AJ245645
<i>Selaginella apoda</i>	U24591
<i>Skeletonema subsalsum</i>	FJ002182
<i>Spirogyra maxima</i>	AF393611
<i>Triticum aestivum</i>	AJ239003
<i>Zea mays</i>	X86563

Tabulka 2. Organismy zahrnuté v analýze 16S rDNA a jejich GenBank accession numbers.

druh	Accession number ITS1
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	EU038291
<i>Closteriopsis acularis</i>	FM205847
<i>Dicloster acuatus</i>	FM205848
<i>Chlorella lobophora</i>	FM205833
<i>Chlorella minutissima</i>	EF030581
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	EU038290
<i>Chlorella sorokiniana</i>	FM205860
<i>Chlorella</i> sp.	EF030584
<i>Chlorella vulgaris</i>	AB162910
<i>Micractinium</i> sp.	FM205879
<i>Parachlorella beijerinckii</i>	FM205845
<i>Parachlorella kessleri</i>	FM205885

Tabulka 3. Organismy zahrnuté v analýze ITS1 a jejich GenBank accession numbers.

gen		18S rDNA	16S rDNA	ITS1
amplifikační schéma				
celková velikost fragmentů užitých v analýze	H1	1692 pb	513 pb	211 pb
	A1	1692 pb	502 pb	211 pb
	H2	1692 pb	508 pb	211 pb

Tabulka 4. Schématické znázornění jednotlivých amplikonů a velikosti asemblovaných genů.

Sekvence tří kmenů chlorel pro molekulární identifikaci a patentovou ochranu (kmen H1)

Následující pasáž o rozsahu 3 stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.